

تاثیر مهاری عصاره های مختلف آرتیمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) بر رده سلولی سرطان معده از طریق القای آپوپتوز

دکتر احمد امامی*، شهرزاد زمانی تقی زاده رابع**، علی آهی***، دکتر محمود محمودی†

*دانشیار گروه فارماکوکینوزی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، **کارشناسی ارشد ایمنولوژی- مرکز تحقیقات ایمنولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد،

***کارشناس گروه فارماکوکینوزی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، †استاد ایمنولوژی- مرکز تحقیقات ایمنولوژی- دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۳۰ تاریخ تایید: ۸۷/۱۳/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: در بررسی های قبلی تاثیر ضد سرطانی گونه های مختلف آرتیمیزیا گزارش شده است. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر عصاره های مختلف آرتیمیزیا آنوا (*Artemisia annua*) بر سلول های سرطان معده صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آرتیمیزیا آنوا به روش عصاره گیری مرحله ای تهیه شدند. رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) و سلول های فیبروبلاستی طبیعی (L929) با غلظت های مختلف عصاره ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و میزان سمیت سلولی توسط تست ام تی تی (MTT) بررسی شد. نتایج بصورت درصد مهار رشد سلولی و غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC_{50}) گزارش شد. بمنظور ارزیابی القای آپوپتوز و نکروز سلولی در سلول های سرطانی روش رنگ آمیزی با انکسین V و پروپیدیم آیوداین (PI) استفاده شد. از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه جهت تجزیه و تحلیل استفاده شد. یافته ها: نتایج حاصل از تست ام تی تی مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول های سرطانی را توسط عصاره های مختلف آرتیمیزیا آنوا نشان داد. عصاره متانلی بیشترین تاثیر مهاری (IC_{50} : برابر ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) را داشت و بیش از سایرین سبب القای آپوپتوز اولیه شد. نتیجه گیری: عصاره های جدا شده از آرتیمیزیا آنوا سبب کاهش قابل توجه رشد سلول های سرطانی معده عمدتاً با واسطه القای آپوپتوز اولیه شدند و همزمان سمیت کمتری بر سلول های طبیعی داشتند. بنابراین تخلیص ماده موثره موجود در این عصاره ها و نیز تعیین مکانیسم تاثیر آنها توصیه می شود.

واژه های کلیدی: آرتیمیزیا آنوا، آپوپتوز، درمنه شیرین، رده سلولی سرطان معده، سمیت سلولی.

مقدمه:

نظرگیری عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع بیماری تلاش برای تهیه داروهای موثرتر با سمیت کمتر ضروری است (۸،۷).

امروزه یکی از استراتژی های جالب توجه در درمان سرطان مداخلات دارویی است که بتواند سبب القای مرگ آپوپتوتیک در سلول های بدخیم شوند (۳،۱). ترکیبات گیاهی با اثرات بولویژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده اند که در درمان سرطان های مختلف موثرند (۱۰،۹).

اعضای خانواده آرتیمیزیا (درمنه) گیاهان

آپوپتوز با ایجاد تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی و نیز حذف سلول های مسن و آسیب دیده سبب حفظ هموستاز بافت های طبیعی بدن شده و مهار یا اختلال در آن در فرآیندهای تغییر شکل بدخیمی، پیشرفت سرطان و متاستاز نقش دارد (۴-۱). بر خلاف نکروز، آپوپتوز در سلول سبب مرگ سلول های مجاور نشده و منجر به التهاب یا آسیب بافتی نمی شود (۵،۶). سرطان از بزرگترین عوامل مرگ و میر در میان انسان ها بوده و درمان های امروزی آن اغلب چندان موثر نبوده و با اثرات جانبی نامطلوب همراه هستند. بنابراین با در

موثر است (۲۱). آرتروزیت (Artesunate) مهمترین مشتق آرتمیزین است که بیشتر از آن محلول در آب بوده و تاثیر ضد مالاریایی بیشتری نیز دارد. در یک مطالعه مشاهده شد که آرتروزیت تاثیر آنتی آتروژنیک داشته و علاوه بر اثر ضد سرطانی، تولید فاکتور رگرایی VEGF (Vascular endothelial growth factor) را نیز در سلول های K562 مهار می کند (۲۲). آرتروزیت سبب القای آپوپتوز سلولی در سلول های اندوتلیال جلدی انسانی نیز می شود (۲۳). ترپنویدها و فلاونوئیدهای دیگری نیز از آرتمیزیانوا جدا شده اند که تاثیر کشندگی آنها بر سلول های سرطانی HT-29، A549، MC F-7، P-388 و KB نشان داده شده است (۲۴).

بنابراین بر طبق مطالعات انجام شده، زیر گونه های مختلف آرتمیزیانوا اثرات ضد سرطانی دارند (۱۷-۱۱). همچنین عصاره ها و ترکیبات ضد سرطانی موثری از آرتمیزیانوا جداسازی شده اند (۲۴-۱۸). بنابراین گیاه آرتمیزیانوا بویژه آرتمیزیانوا داوطلب مناسبی برای بررسی اثرات ضد توموری و جداسازی ترکیبات موثره می باشد. با توجه به اینکه تاثیر ضد سرطانی برخی عصاره های آرتمیزیانوا بر برخی رده های سلولی از جمله رده سلولی سرطان معده هنوز بررسی نشده، بنابراین در این تحقیق عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آرتمیزیانوا تهیه شد و تاثیر کشندگی آنها بر سلول های سرطان معده بررسی گردید تا با یافتن عصاره موثرتر امکان جداسازی ترکیبات خالص جدیدتر از این گیاه فراهم شود. همچنین در این مطالعه با توجه به اهمیت القای مرگ آپوپتوتیک سلولی، الگوی مرگ سلول های سرطانی تیمار شده با عصاره ها نیز ارزیابی گردید. عصاره متانلی قطبی ترین عصاره بوده و حاوی ترکیبات قطبی است و به ترتیب از عصاره های اتیل استاتی، دی کلرومتانی تا هگزانی میزان غیر قطبی بودن بیشتر می شود به گونه ای که عصاره هگزانی بیشتر از سایرین غیر قطبی است. هر عصاره با توجه به میزان قطبیت حاوی ترکیبات متفاوتی است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تهیه عصاره های

دارویی مهمی در دنیا محسوب می شوند و حاوی مواد مؤثره مختلفی هستند. آرتمیزیانوا گونه های مختلفی دارد و بعضی از گونه های آن تنها بومی ایران می باشند. تاثیر سمیت سلولی بعضی از گونه های آرتمیزیانوا بر بعضی از رده های سلولی سرطانی گزارش شده است. عصاره متانلی آرتمیزیانوا (Artemisia argyi) و ترکیب فلاونی جاسئودین (Jaceosidin) موجود در آن تکثیر چندین رده سلولی توموری از جمله سلول های سرطانی سرویکس (Hela) را مهار می کند (۱۱، ۱۲). آرتمیزیانوا آسیاتیکا (Artemisia asiatica) و ترکیب یوپاتیلین (Eupatilin) آن با مکانیسم شناخته شده ای سبب القای آپوپتوز سلول های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سلول های سرطان معده (AGS) می شود (۱۳، ۱۴). تاثیر کشندگی آرتمیزیانوا کاپی لاریس (Artemisia capillaries)، آرتمیزیانوا یوایوموگی (Artemisia iwaiyomogi) و آرتمیزیانوا پرنسپ (Artemisia princeps) نیز بر رده سلول های سرطانی مختلف گزارش شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷). القای آپوپتوز در سلول های هپاتوکارسینوما (SMMC-7721) تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از روغن ضروری جدا شده از آرتمیزیانوا توسط Li و همکاران نشان داده شده است (۱۸). غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتانلی آرتمیزیانوا سبب مهار رشد سلول های رده سرطان کبد (SMMC-7721)، کولون (LoVo و SW-116)، مری (CaEs-17) و معده (BGC-823) تا ۷۰ درصد شد و از آنجایی که میزان مهار رشد این سلول ها در تیمار با عصاره آبی بسیار کمتر از عصاره اتانلی بود این طور استنتاج شد که ترکیبات موثره گیاه عمدتاً در عصاره اتانلی وجود دارند (۱۹). آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شده از آرتمیزیانوا نیز در شرایط برون تنی کشندگی بالایی بر سلول های سرطانی از جمله رده سلولی هپاتوکارسینوما داشته و از ایجاد سرطان پستان در رات های تیمار شده با ماده سرطانزای DMBA (Dimethyl benz anthracene) جلوگیری می کند (۲۰). آرتمیزینین علاوه بر تاثیر ضد مالاریایی علیه سلول های سرطانی ختلف از جمله لوسمی و سرطان کولون نیز

(AGS) و سلول های فیروپلاستی طبیعی (L929) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول ها در فلاسک های حاوی محیط کشت DMEM، حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور CO₂ دار کشت داده شدند. برای انجام تست های مختلف زمانی که حداقل ۷۰ درصد سلول ها در فلاسک کشت به رشد کافی رسیدند توسط تریپسین-اتیلن دی آمین تتراسدیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا شده و با دور rpm ۱۱۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۱ سی سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآورده شده و درصد زنده بودن سلول های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از هموسیتمتر تعیین شد. از سلول های با درصد زنده بودن بالاتر از ۹۰ درصد برای انجام تست ها استفاده شد.

تیمار سلول ها با غلظت های مختلف عصاره ها:

در این مطالعه بنیادی، ابتدا غلظت اولیه ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره ها در محیط کشت DMEM، حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین تهیه شد و با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد. سپس غلظت های مختلف عصاره ها (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) در محیط کشت تهیه شدند. تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شده و برای هر غلظت سه چاهک اختصاص داده شد. سه چاهک نیز بعنوان کنترل بدون عصاره (کنترل منفی) که تنها در محیط کشت ذکر شده کشت داده شدند در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول ها بصورت گروه های مختلف تست با غلظت های مختلف عصاره ها (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و محیط کشت مناسب تیمار شدند.

مختلف قطبی تا غیر قطبی از آرتمیزیا آنوا و بررسی تاثیر آنها بر سلول های سرطانی معده (AGS) و طبیعی (L929) و مقایسه تاثیر این عصاره ها با هم و ارزیابی مکانیسم القای مرگ سلول های سرطانی توسط آنها صورت گرفت.

روش بررسی:

تهیه عصاره های آرتمیزیا آنوا:

اندام های هوایی گیاه آرتمیزیا آنوا از اسلام آباد نزدیک مراوه، جاده تپه - شهر آباد، استان خراسان شمالی جمع آوری و سپس خشک شدند. حدود ۱۰۰ گرم از اندام های هوایی گیاه پودر شده و به مدت ۲۴ ساعت در متانل خالص حل گردید. سپس نمونه با استفاده از دستگاه پرکولاتور عصاره گیری شد. محلول عصاره گیری شده در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و تحت فشار کاهش یافته، تغلیظ شده و سپس خشک شد. ابتدا مقدار کمی آب به متانل اضافه شد تا محلول آبی - متانلی ۹۵ درصد بدست آید. این محلول به عصاره تغلیظ شده اضافه شد و سپس توسط حجم مساوی هگزان (۳ بار) عصاره گیری شد تا عصاره حاوی ترکیبات غیر قطبی بدست آید. لایه متانلی تبخیر و عصاره خشک شد و سپس در آب بصورت سوسپانسیون درآورده شد. سپس سوسپانسیون حاصله به ترتیب بین حلال های دی کلرومتان و اتیل استات تفکیک شد. هر عصاره در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و تحت فشار کاهش یافته تغلیظ یافته و سپس خشک شد. عصاره متانلی قطبی ترین عصاره بوده و حاوی ترکیبات قطبی است و به ترتیب از عصاره های اتیل استات، دی کلرومتانی تا هگزانی میزان غیر قطبی بودن بیشتر می شود به گونه ای که عصاره هگزانی کاملاً غیر قطبی است. هر عصاره با توجه به میزان قطبیت حاوی ترکیبات متفاوتی است.

نگهداری و کشت سلولی:

سلول های سرطانی آدنوکارسینومای معده

در گروه سلول های کنترل (کنترل منفی)، سلول های سرطانی و سلول های طبیعی (L929) تنها در محیط کشت DMEM، حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین انکوبه شدند.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از تست ام تی تی:

به منظور بررسی تاثیر عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آرتمیزیا آنوا بر رشد و تکثیر سلول های سرطانی و فیروبلاستی کشت داده شده از روش رنگ سنجی ام تی تی استفاده شد (۲۵). اساس این تست شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفو کساید به صورت محلول در می آیند. هر چه سلول ها فعال تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۲۵ میکرولیتر از محلول ام تی تی (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شد. سپس مایع رویی هر چاهک خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفو کساید به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای تشکیل شده در ته چاهک ها بطور کامل حل شوند. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده و سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (دی متیل سولفو کساید) قرائت شد. نتایج حاصله بصورت درصد مهار رشد سلولی و IC_{50} (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰٪ شود) از روی منحنی غلظت (میکروگرم در میلی لیتر) - درصد مهار رشد سلولی گزارش شدند. درصد مهار رشد سلولی از روی فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) - 1$$

بررسی آپوپتوز و نکروز سلولی توسط تکنیک فلوسایتومتری:

بمنظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده (آپوپتوز و نکروز) در سلول های آدنوکارسینومای معده توسط تکنیک فلوسایتومتری از روش رنگ آمیزی با انکسین V کونزوگه با فلئورسین ایزوتیوسیانات (انکسین FITC-V) و پروپیدوم آیوداین (PI) (ساخت شرکت abcam) استفاده شد. در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفولیپید فسفاتیدیل سرین غشای پلاسمایی که از سطح داخلی غشا به سمت خارجی حرکت می کند با افینیتی بسیار بالایی به پروتئین انکسین V متصل می شود که با ترکیب فلورسنت FITC کونزوگه شده است. پروپیدوم آیوداین نیز به DNA متصل می شود. با استفاده از این روش نوع مرگ سلول های سرطانی بصورت درصد آپوپتوز اولیه و درصد آپوپتوز ثانویه / نکروز پس آپوپتوتیک مشخص می شود. برای انجام این تست، تعداد 5×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه ای ریخته شده و با یک شب انکوبه شدن به کف چاهک ها متصل شدند. سپس غلظت های مختلف عصاره ها (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول های چسبیده توسط محلول تریسین- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۱ درصد از ته چاهک ها جدا شده و همراه سلول های شناور در محیط کشت چاهک با بافر فسفات سالین سرد و بافر کلسیم (CaCl₂, NaCl, HEPES) شستشو داده شدند. سپس سلولها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی با انکسین FITC-V و PI انکوبه شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, FACS Calibur) مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت سلولی انکسین FITC-V مثبت و PI منفی به عنوان آپوپتوز اولیه، جمعیت های سلولی انکسین FITC-V مثبت و PI مثبت و یا انکسین FITC-V منفی و PI مثبت بعنوان آپوپتوز ثانویه / نکروز پس آپوپتوتیک در نظر گرفته شدند.

آنالیز آماری نتایج حاصله:

به منظور مقایسه میانگین داده ها بین گروه های مختلف تست و کنترل نتایج حاصل از گروه های

۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از این عصاره تا غلظت صد در صد کشنده ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تفاوت معنی دار بیشتری نسبت به غلظت کشنده ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره دی کلرومتانی آرتمیزیا آنوا مشاهده شد ($P < 0/01$). تنها غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. غلظت کشنده صد در صد عصاره هگزانی ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود و غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آن نسبت به گروه کنترل و نسبت به هم تفاوت معنی داری نداشتند.

از نظر مقایسه تاثیر مهار غلظت های یکسان عصاره های مختلف با یکدیگر، در تمامی غلظت های بررسی شده بیشترین تاثیر مهار را عصاره متانی و کمترین تاثیر مهار را عصاره هگزانی بر سلول های سرطانی معده داشت. غلظت های یکسان عصاره های اتیل استاتی و دی کلرومتانی از نظر مهار رشد سلول های سرطانی معده تفاوت مختلفی با هم داشتند به طوری که در غلظت های ۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در

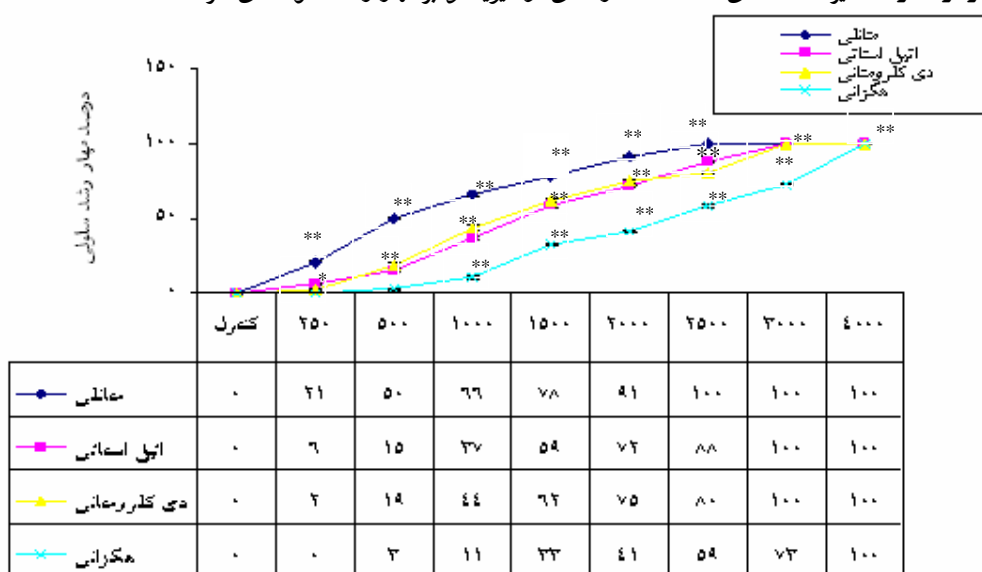
مختلف کنترل و تست با توجه به نرمال بودن با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها:

تاثیر عصاره های آرتمیزیا آنوا بر سمیت سلولی:

مقدار IC50 برای عصاره های متانی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی به ترتیب ۵۰۰، ۱۲۵۹، ۱۱۶۷ و ۲۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. غلظت های مختلف عصاره متانی آرتمیزیا آنوا تا غلظت صد در صد کشنده ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به سلول های کنترل از نظر درصد مهار رشد سلول های سرطانی معده تفاوت معنی دار داشت ($P < 0/01$). از نظر درصد مهار رشد سلول های سرطانی معده نسبت به سلول های کنترل و نسبت به هم، تنها غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتیل استاتی آرتمیزیا آنوا نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری کمتری داشت ($P < 0/05$). ولی در غلظت های بالاتر از

نمودار شماره ۱: تاثیر غلظت های مختلف عصاره های آرتمیزیا آنوا بر مهار رشد سلول های سرطان معده



غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)

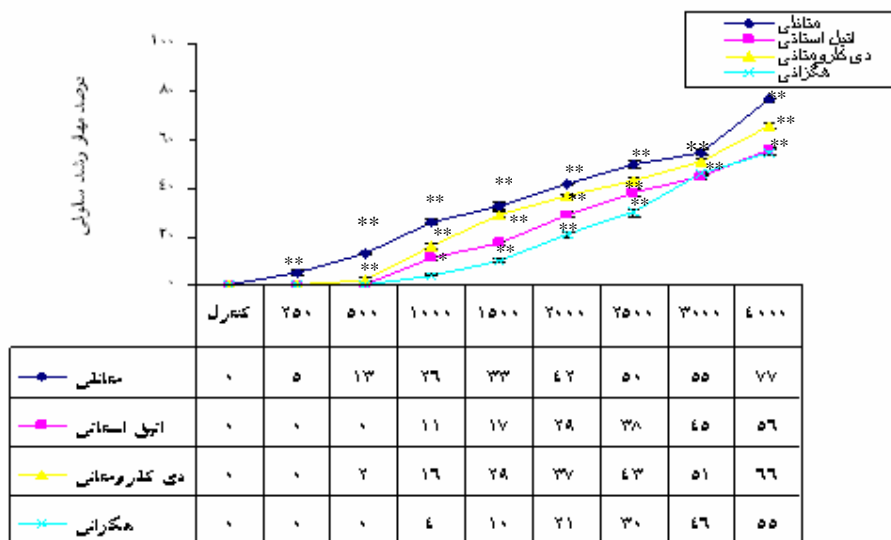
سلول های سرطانی معده AGS همراه با غلظت های مختلف عصاره های متانی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام تی تی ارزیابی شد. $P < 0/05$ ، $P < 0/001$ نسبت به گروه کنترل.

میکروگرم در میلی لیتر تفاوت معنی داری نداشت. غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره هگزانی آرتمیزیا آنوا هیچ تاثیر مهاری بر رشد سلول های طبیعی (L929) نداشتند. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آن نیز تاثیر مهاری بر سلول های طبیعی (L929) نشان داد ($P < 0.05$).

بیشترین درصد مهاری را غلظت های مختلف عصاره متانلی آرتمیزیا آنوا بر رشد سلول های طبیعی (L929) داشتند ولی درصد مهاری رشد در هیچ یک از غلظت ها بیشتر از درصد مهاری رشد سلول های سرطانی معده نبود. بالاترین درصد کشندگی را عصاره متانلی در غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و کمترین درصد کشندگی را عصاره های اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بر رشد سلول های طبیعی (L929) داشتند. عصاره های اتیل استاتی و هگزانی در غلظت های ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و کمتر از آن هیچ تاثیر کشندگی بر سلول های طبیعی نداشتند. با وجود اینکه عصاره هگزانی تاثیر مهاری کمتری

میلی لیتر عصاره اتیل استاتی قوی تر بود و در سایر غلظت ها عصاره دی کلرومتانی با غلظت بالاتری رشد سلول های سرطانی را مهار کرد (نمودار شماره ۱). درصد مهار رشد سلول های فیروپلاستی طبیعی (L929) بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) عصاره متانلی آرتمیزیا آنوا نشان داد (نمودار شماره ۲). غلظت های مختلف عصاره متانلی آرتمیزیا آنوا نسبت به سلول های کنترل و نسبت به هم از نظر درصد مهار رشد سلول های طبیعی (L929) تفاوت معنی دار داشتند ($P < 0.01$). غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتیل استاتی آرتمیزیا آنوا هیچ تاثیر مهاری بر رشد سلول های طبیعی (L929) نداشتند ولی در غلظت های بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از این عصاره تفاوت مهاری معنی دار مشاهده شد ($P < 0.01$). عصاره دی کلرومتانی آرتمیزیا آنوا در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر هیچ تاثیر مهاری بر رشد سلول های طبیعی (L929) نداشت. غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آن نسبت به گروه کنترل و نسبت به غلظت ۲۵۰

نمودار شماره ۲: تاثیر غلظت های مختلف عصاره های آرتمیزیا آنوا بر مهار رشد سلول های طبیعی (L929)



غلظت عصاره (میکروگرم بر میلی لیتر)

سلول های طبیعی (L929) همراه با غلظت های مختلف عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام تی تی ارزیابی شد. $P < 0.05$ ، $P < 0.001$ نسبت به گروه کنترل.

ثانویه در سلول های سرطانی می شوند ولی بطور کلی نقش آپوپتوز اولیه در مرگ سلولی بیشتر بود.

با توجه به عدم پاسخ مطلوب سرطان ها به درمان و پیشرفت سریع آن، تحقیق در جهت تولید داروهایی با کارآیی بیشتر و سمیت کمتر ادامه دارد. ترکیبات گیاهی بسیار با اثرات بیولوژیکی متنوعی وجود دارند که بخشی از داروهای ضد سرطانی را در علم داروسازی نوین شامل می شوند (۸،۷). از این میان، اعضای خانواده گیاه *آرتمیزیا* گیاهان دارویی مهمی در سرتاسر دنیا محسوب می شوند و تاثیر سمیت سلولی بسیاری از گونه های آن بر رده های سلولی سرطانی گزارش شده است (۱۷-۱۱). اثرات بیولوژیک *آرتمیزیا آنوا* نیز از دیر باز مورد توجه بوده و امروزه ترکیبات مختلفی از آن جدا شده و اثرات بیولوژیکی آنها مشخص شده است. غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از روغن ضروری جدا شده از *آرتمیزیا آنوا* سبب القای آپوپتوز در سلول های هپاتوکارسینوما SMMC-7721 شد (۱۸). *آرتمیزین* جدا شده از *آرتمیزیا آنوا* نیز در شرایط برون تی کشندگی بالایی بر سلول های سرطانی از جمله رده سلولی هپاتوکارسینوما داشته و از ایجاد سرطان پستان در رات های تیمار شده با ماده سرطانزای DMBA جلوگیری می کند (۲۰). *آرتمیزین* علاوه بر تاثیر ضد مالاریایی علیه سرطان های مختلف از جمله لوسمی و سرطان کولون موثر است (۲۱). *آرترونیت* مهمترین مشتق *آرتمیزین* است که بیشتر از آن محلول در آب بوده و تاثیر ضد مالاریایی بیشتری نیز دارد. در یک مطالعه گزارش شد که *آرترونیت* تاثیر آنتی آنژیوژنیک داشته و علاوه بر اثر ضد سرطانی، تولید فاکتور رگزایی VEGF را نیز در سلول های K562 مهار می کند (۲۲). *آرترونیت* سبب القای آپوپتوز سلولی در سلول های آندوتلیال جلدی انسانی نیز می شود (۲۳). ترپنوئیدها و

نسبت با سایر عصاره ها بر سلول های سرطانی معده داشت ولی تقریباً بطور همزمان کمترین مهار را نیز بر سلول های طبیعی (L929) داشت (نمودار شماره ۲).

تاثیر عصاره های *آرتمیزیا آنوا* بر الگوی مرگ سلولی القا شده:

بمنظور بررسی الگوی مرگ سلولی (آپوپتوز و یا نکروز) در سلول های آدنوکارسینوما معده انسانی (AGS) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با غلظت IC_{50} عصاره های *آرتمیزیا آنوا*، از روش رنگ آمیزی سلولی با انکسین V کونزوگه با فلئورسین ایزوتیوسیانات (انکسین FITC-V) و پروپیدوم آیوداین (PI) استفاده شد. طبق نتایج حاصل از تکنیک فلوئوسایتمتری، درصد القای آپوپتوز اولیه در سلول های سرطانی معده (AGS) تیمار شده با عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی و سلول های تیمار نشده کنترل منفی به ترتیب ۶۰، ۵۰، ۵۱ و ۷ درصد و میزان القای آپوپتوز ثانویه/نکروز پس آپپتوتیک به ترتیب ۵، ۱۳، ۶، ۱۵ و ۰ درصد بود.

بحث:

به منظور یافتن ترکیبات گیاهی ضد سرطانی قوی و بی خطر از میان گیاهان بومی کشور، در این تحقیق تاثیر عصاره های جدا شده از *آرتمیزیا آنوا* رشد کرده در ایران بر سمیت سلول های سرطانی معده (AGS) و سلول های فیروبلستی طبیعی (L929) توسط تست ام تی تی بررسی شد. یافته های حاصله نشان دادند که عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی سبب مهار رشد سلول های سرطانی شده و همزمان سمیت کمتری بر سلول های طبیعی (L929) داشتند. بررسی الگوی مرگ سلول های سرطانی تیمار شده با عصاره نیز نشان داد که تمام عصاره ها بویژه عصاره متانلی سبب القای آپوپتوز اولیه و نیز آپوپتوز

فلاونوئیدهای دیگری نیز از آرتمیزیا آنوا جدا شده اند که تاثیر کشندگی بر سلول های سرطانی HT-29، A549، MCF-7، P-388 و KB دارند (۲۴). با توجه به اینکه با گذشت زمان زیاد هنوز هم اثرات دارویی گیاه آرتمیزیا آنوا مورد توجه محققان قرار دارد و ترکیبات مختلفی با خاصیت ضد سرطانی از آن جداسازی شده است بنابراین در این تحقیق نیز تاثیر عصاره های مختلف این گیاه بر رشد سلول های سرطانی معده بررسی شد که قبلاً بررسی بر آن صورت نگرفته بود. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره اتانلی آرتمیزیا آنوا سبب مهار رشد سلول های رده سرطان کبد (SMMC-7721)، کولون (SW-116 و LoVo)، مری (CaEs-17) و معده (BGC-823) را تا ۷۰ درصد شد و از آنجایی که میزان مهار رشد این سلول ها در تیمار با عصاره آبی بسیار کمتر بود این طور استنتاج شد که ترکیبات موثره گیاه در عصاره اتانلی وجود دارند (۱۹). در مقایسه نتایج بدست آمده در تحقیق ما با گزارش قبلی (۱۹) بطور مقایسه ای، غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره های متانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آرتمیزیا آنوا کمتر از تاثیر گزارش شده غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتانلی آرتمیزیا آنوا سبب مهار رشد سلول های سرطانی شدند. از آن جایی که محدوده درصد مهار رشد سلول های سرطانی در گزارش قبلی بین ۵۱ تا ۷۰ درصد بود بنابراین عصاره های متانلی بررسی شده در تحقیق ما تاثیر مهاری قابل توجهی داشت. ما نیز در این تحقیق همانند گزارش قبلی به این نتیجه رسیدیم که عصاره محلول در الکل آرتمیزیا آنوا مواد موثره بیشتری دارد ولی از آنجایی که عصاره های اتیل استاتی و دی کلرومتانی نیز کشندگی قابل توجهی بر سلول های سرطانی معده (AGS) داشتند و عمدتاً منجر به القای مرگ آپوپتوتیک سلولی شدند، بنابراین جداسازی ترکیبات غیر قطبی موجود در این عصاره ها نیز می تواند ترکیبات موثره جدیدی را معرفی نماید.

در مقایسه تاثیر مهاری غلظت های یکسان عصاره های مختلف با یکدیگر، بیشترین تاثیر مهاری را عصاره متانلی و کمترین تاثیر را عصاره هگزانی بر سلول های سرطانی معده داشت. غلظت های یکسان عصاره های اتیل استاتی و دی کلرومتانی نیز تفاوت مختلفی داشتند به طوری که غلظت های ۲۵۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره اتیل استاتی و غلظت های بالاتر عصاره دی کلرومتانی رشد سلول های سرطانی را مهار کردند. تمامی عصاره های مورد بررسی در تمام غلظت ها سمیت کمتری بر رشد سلول های طبیعی (L929) داشتند. اگرچه عصاره های متانلی، دی کلرومتانی، اتیل استاتی و هگزانی جدا شده از آرتمیزیا آنوا از نظر مهار رشد و تکثیر سلول های سرطانی معده (AGS) تفاوت قابل توجهی با یکدیگر داشتند ولی عمدتاً با القای آپوپتوز اولیه منجر به مرگ سلول های سرطانی معده (AGS) شدند که با توجه به اهمیت القای آپوپتوز سلولی، استفاده از این عصاره ها به عنوان داوطلب مناسب برای بررسی های بیشتر و جداسازی ترکیبات موثره در آنها پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری:

عصاره های جدا شده از آرتمیزیا آنوا تاثیر ضد سرطانی قوی بر سلول های سرطان معده (AGS) داشتند و بطور مطلوب آپوپتوز را تا حد بالایی در این سلول ها القا کرده و از این طریق سبب مرگ سلول های سرطانی شدند. همچنین همزمان سمیت کمتری بر سلول های طبیعی داشتند. بنابراین بررسی مکانیسم دقیق مولکولی تاثیر آپوپتوتیک این عصاره ها و بررسی تاثیر آنها بر مهار رشد سایر سلول های سرطانی، بهبود موش های توموری، جداسازی ترکیبات موثره موجود در این عصاره ها و بررسی تاثیر ضد سرطانی آنها و نیز تعیین مکانیسم تاثیر ترکیبات موثره خالص جداسازی شده توصیه می شود.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد تحقیقاتی ۸۷۱۸۷ صورت گرفته است.

منابع:

1. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar; 267(5203): 1456-62.
2. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol*. 1997 Nov; 6(3): 133-42.
3. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*. 1998 Jul; 68(1): 29-43.
4. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 1995 Oct; 9(13): 1277-87.
5. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251-306.
6. Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*. 1987 Dec; 153(4): 313-16.
7. Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM. Natural products as sources of new drugs over the period. *J Nat Prod*. 2003 Jul; 66(7): 1022-37.
8. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem*. 2005 Nov; 13(21): 5892-908.
9. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human cells. *Blood*. 1998 Aug; 92(3): 999-1002.
10. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human tumor cancer cell lines by polyphenols. *Carcinogen*. 1998 Apr; 19(4): 611-16.
11. Lee HG, Yu KA, Oh WK, Baeg TW, Oh HC, Ahn JS, et al. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J Ethnopharmacol*. 2005 Apr; 98(3): 339-43.
12. Seo JM, Kang HM, Son KH, Kim JH, Lee CW, Kim HM, et al. Antitumor activity of flavones isolated from *Artemisia argyi*. *Planta Med*. 2003 Mar; 69(3): 218-22.
13. Seo HJ, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Mutat Res*. 2001 Sep; 496(1-2): 191-8.
14. Kim DH, Na HK, Oh TY, Kim WB, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces cell cycle arrest in ras-transformed human mammary epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2004 Sep; 68(6): 1081-87.
15. Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res*. 2000 Jan; 91(1): 113-7.
16. Jeong SH, Koo SJ, Ha JH, Ryu SY, Park HJ, Lee KT. Induction of apoptosis by yomogin in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*. 2004 Jul; 27(7): 1106-11.
17. Nakamura Y, Kawamoto N, Ohto Y, Torikai Y, Murakami A, Ohigashi H. A diacetylenic spiroketal enol ether epoxide, AL-1, from *Artemisia lactiflora* inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-

- 13-acetate-induced tumor promotion possibly by suppression of oxidative stress. *Cancer Lett.* 1999 Jun; 140(1-2): 37-45.
18. Li Y, Li MY, Wang L, Jiang ZH, Li WY, Li H. Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia Annua L.* *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004 May; 35(3): 337-9.
19. Sun J, Liu BR, Hu WJ, Yu LX, Qian XP. In vitro anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional chinese medicines on human digestive tumor cell lines. *Phytother Res.* 2007 Nov; 21(4): 1102-4.
20. Lai H, Singh N. Oral *artemisinin* prevents and delays the development of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Lett.* 2006 Jan; 231(1): 43-8.
21. Baldi A, Dixit VK. Yield enhancement strategies for *artemisinin* production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technolo.* 2008 Jul; 99(): 4609-14.
22. Zhou HJ, Wang WQ, Wu GD, Lee J, Li A. Artesunate inhibits angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Vascul Pharmacolo.* 2007 Aug-Sep; 47(2-3): 131-8.
23. Huan-huan C, Li-Li Y, Shang-bin L. Artesunate reduces chicken chorioallantoic membrane neovascularisation and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell. *Cancer Lett.* 2004 Aug; 211(2): 163-73.
24. Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 1994 Feb; 60(1): 54-7.
25. Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983 Dec; 65(1-2): 55-63.

Received: 19/Apr/2009

Accepted: 5/Oct/2009

The inhibitory effect of *Artemisia annua* extracts on gastric cancer cells via apoptosis induction

Emami A (PhD)*, Zamani Taghizadeh Rabe Sh (MSc)**, Ahi A (BSc)***,
Mahmoudi M (MD)†¹

Associate professor, Pharmacognoesy Dept., Mashhad Univ. of Med. Sci.

Mashhad, Iran, **Immunology Research Center, Mashhad Univ. of Med. Sci.

Mashhad Iran, ***Pharmacognoesy Dept., Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad

Iran, †Professor, Immunology Dept., Immunology Research Center Mashhad
Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran.

Background and aim: Previous studies have shown an anti-tumoral effect for different species of *Artemisia*. This study was performed to evaluate the anti-tumoral effects of different kinds of *Artemisia annua* extracts on gastric cancer cells.

Methods: Methanol, ethylacetate, dichloromethane and hexan extracts of *Artemisia annua* were prepared by step to step procedure. Cultivated gastric cancer cell line (AGS) and normal fibroblast cells (L929) were incubated with different concentrations of extracts for 24 hours and cell growth inhibition was determined using MTT assay and results were reported as IC₅₀ (concentration that caused 50 percent inhibition of cells growth). Annexin V and propidium iodide (PI) staining was used to evaluate the apoptosis and/or necrosis induction in cancer cells. One way ANOVA was used for analysis.

Results: The results obtained from MTT assay showed a strong and dose-dependent inhibition of cancer cell growth by different *Artemisia annua* extracts. The most cytotoxic effect was obtained by methanolic extract (IC₅₀: 500 µg/ml) and it caused apoptosis more than other extracts.

Conclusion: Isolated extracts from *Artemisia annua* caused a significant decrease in gastric cancer cell growth mainly by induction of apoptosis and at the same time they had less toxicity on normal cells. Therefore, Isolation and purification of effective compound/s from this extracts and determination of their mechanisms of action is suggested.

Keywords: Apoptosis, *Artemisia annua*, Cytotoxicity, Gastric cancer cell line.

¹Corresponding author:

Immunology Research
Center BuAli Research
Institute, Toos Bld,
Mashhad, Iran.

Tel:

0511-7112617

E-mail:

mahmoudim@mums.ac.ir