● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفدهم، شمارهٔ ۳، ص ۲۲۵-۲۱۵، ۱۳۸۹

مقالهٔ پژوهشی

ارزیابی سمیت عصاره متانلی *Artemisia annua* بر رده‌های سلولی سرطانی در شرایط برون‌تنی

احمد امامی [۱]، شهرزاد زمانی تقی‌زاده رابع [۲]، علی آهی [۳]، محمود محمودی [۴*]

خلاصه

مقدمه: عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع سرطان محققین را به تلاش برای دست‌یابی به داروهای مؤثرتر با اثرات جانبی کم‌تر واداشته است. اعضای خانواده آرتمیزیا (درمنه) گیاهان دارویی مهمی در دنیا محسوب می‌شوند و تأثیر سمیت سلولی برخی از گونه‌های آرتمیزیا بر بعضی از رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است. در بررسی‌های قبلی تأثیر ضد سرطانی گونه‌های مختلف آرتمیزیا گزارش شده بود. این تحقیق با هدف ارزیابی تأثیر عصاره متانلی *Artemisia annua* بر رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی صورت گرفت.

روش: ابتدا عصاره متانلی *Artemisia annua* تهیه شد. رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS)، سرویکس (Hela)، کولون (HT-29)، پستان (MCF-7) و سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی (L929) با غلظت‌های مختلف عصاره متانلی به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شده و میزان مهار رشد سلول‌های تیمار شده توسط تست رنگ سنجی ام تی تی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست ام تی تی مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف را توسط عصاره متانلی *Artemisia annua* نشان داد. عصاره متانلی جدا شده از این گیاه سبب کاهش قابل توجه رشد تمام سلول‌های سرطانی مورد بررسی شد و همزمان سمیت کمتری بر سلول‌های طبیعی داشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه احتمال اثرات ضد توموری عصاره متانلی *Artemisia annua* را مطرح کرده و انجام مطالعات تکمیلی به منظور جداسازی ترکیبات موثره در آن و بررسی تأثیر آن بر مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی توموری را پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *Artemisia annua*، رده سلولی سرطانی و نرمال، مهار رشد سلولی، تست ام تی تی

۱- دانشیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۲- دانش‌آموخته ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۳- پژوهشگر، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۴- استاد گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، میدان بوعلی، بلوار توس، مشهد ● **آدرس پست الکترونیک:** mahmoudim@mums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۵/۱۰ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۸/۱۰/۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۸/۱۰/۱۶

مقدمه

سرطان بزرگترین عامل مرگ و میر در میان انسان‌ها بوده و درمان‌های امروزی آن اغلب چندان مؤثر نبوده و با اثرات جانبی نامطلوب همراه هستند. بنابراین با در نظرگیری عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع بیماری تلاش برای تهیه داروهای مؤثرتر با سمیت کمتر ضروری است (۱،۲). یکی از استراتژی‌های درمان سرطان مداخلات دارویی است که بتواند سبب القای مرگ سلول‌های بدخیم شوند (۳،۴). ترکیبات گیاهی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده‌اند که در درمان سرطان‌های مختلف موثرند (۵،۶). اعضای خانواده آرتمیزیا (Artemisia) (درمنه) گیاهان دارویی مهمی در دنیا محسوب می‌شوند و حاوی مواد مؤثره مختلفی هستند. آرتمیزیا گونه‌های مختلفی دارد و بعضی از گونه‌های آن تنها بومی ایران می‌باشند (۹-۷). تأثیر سمیت سلولی برخی از گونه‌های آرتمیزیا بر بعضی از رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است. عصاره متانولی Artemisia argyi و ترکیب فلاونی جاسئوسیدین (Jaceosidin) موجود در آن تکثیر چندین رده سلولی توموری از جمله سلول‌های سرطانی سرویکس (Hela) را مهار می‌کند (۱۰،۱۱). *Artemisia asiatica* و ترکیب یوپاتیلین (Eupatilin) آن با مکانیسم شناخته شده‌ای سبب القای آپوپتوز سلول‌های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سلول های سرطان معده (AGS) می‌شود (۱۲،۱۳). تأثیر کشندگی *Artemisia capillaris*، *Artemisia iwayomogi* و *Artemisia princep* نیز بر رده سلول‌های سرطانی مختلف گزارش شده است (۱۶-۱۴). القای آپوپتوز در سلول‌های هپاتوکارسینومای SMMC-7721 تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اسانس جدا شده از *Artemisia annua* نیز گزارش شده است (۱۷). غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانلی *Artemisia annua* سبب مهار رشد سلول‌های رده سرطان کبد (SMMC-7721)، کولون (SW-116 و LoVo)، مری (CaEs-17) و معده (BGC-823) تا ۷۰ درصد شد و از آنجایی که میزان مهار رشد این سلول‌ها در تیمار با عصاره آبی بسیار کمتر از عصاره اتانلی بود این طور نتیجه‌گیری شده است که ترکیبات موثره گیاه عمدتاً در عصاره اتانلی وجود داشته‌اند (۱۸). آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شده از *Artemisia annua* نیز در شرایط برون تنی کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی از جمله رده سلولی هپاتوکارسینوما داشته و از ایجاد سرطان پستان در رات‌های تیمار شده با ماده سرطان‌زای DMBA جلوگیری می‌کند (۱۹). آرتمیزینین (Artemisinin) علاوه بر تأثیر ضد مالاریایی علیه سرطان‌های مختلف از جمله لوسمی و سرطان کولون نیز موثر است (۲۰). آرتزونیت (Artesunate) مهمترین مشتق آرتمیزین است که بیشتر از آن محلول در آب بوده و تأثیر ضد مالاریایی بیشتری نیز دارد. در یک مطالعه مشاهده شد که آرتزونیت تأثیر آنتی آنژیوژنیک داشته و علاوه بر اثر ضد سرطانی، تولید فاکتور رگزایی (Vascular Endothelial Growth Factor :VEGF) را نیز در سلول‌های K562 مهار می‌کند (۲۱). آرتزونیت سبب القای آپوپتوز سلولی در سلول‌های‌اندوتلیال جلدی انسانی نیز می‌شود (۲۲). ترپنوئیدها و فلاوونوئیدهای دیگری نیز از Artemisia annua جدا شده‌اند که تأثیر کشندگی آن‌ها بر سلول های سرطانی HT-29، A549، MCF-7، P-388 و KB نشان داده شده است (۲۳).

بنابراین بر طبق مطالعات انجام شده، زیر گونه‌های مختلف آرتمیزیا اثرات ضد سرطانی دارند (۱۶-۱۰). همچنین عصاره ها و ترکیبات ضد سرطانی موثری از *Artemisia annua* جداسازی شده‌اند (۲۳-۱۷). بنابراین گیاه آرتمیزیا به‌ویژه *Artemisia annua* داوطلب مناسبی برای بررسی اثرات ضد توموری و جداسازی ترکیبات موثره می‌باشد. با توجه به اینکه تأثیر ضد سرطانی عصاره متانلی *Artemisia annua* بر برخی رده‌های سلولی از جمله رده‌های

سلولی سرطانی معده (AGS)، سرویکس (Hela)، کولون (HT-29) و پستان (MCF-7) هنوز بررسی نشده است، بنابراین در این تحقیق عصاره متانلی که شامل عصاره قطبی و ترکیبات قطبی می‌باشد از گیاه *Artemisia annua* تهیه شد و تأثیر کشندگی آن بر سلول‌های سرطانی مختلف و سلول‌های طبیعی بررسی گردید. با بررسی کارایی عصاره تهیه شده امکان جداسازی ترکیبات موثره در آن و نیز ارزیابی تأثیر آنها بر مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی توموری در آینده امکان‌پذیر می‌باشد.

روش بررسی

تهیه عصاره متانلی *Artemisia annua*

اندام‌های هوایی گیاه *Artemisia annua* از اسلام آباد نزدیک مراوه، جاده تپه — شهر آباد، استان خراسان شمالی جمع آوری و خشک شدند. گیاهان توسط مرکز تحقیقات مراتع و جنگل‌ها، وزارت جهاد کشاورزی، ایران شناسایی گردیدند. حدود ۱۰۰ گرم از اندام‌های هوایی گیاه پودر شد و به مدت ۲۴ ساعت در متانل خالص خیسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه پرکولاتور عصاره گیری صورت گرفت. محلول عصاره گیری شده در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و تحت فشار کاهش یافته، تغلیظ و سپس خشک شد.

نگهداری و کشت سلولی

رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS) ، سرویکس (Hela)، کولون (HT-29)، پستان (MCF-7) و سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی (L929) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM، ۱۰٪ FCS، ۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور CO_2 دار کشت داده شدند. برای انجام تست، سلول‌ها توسط تریپسین–EDTA از ته فلاسک جدا شده و با دور ۱۱۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در۱ سی سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآورده شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود درسوسپانسیون سلولی با مخلوط کردن نسبت مساوی از تریپان‌بلو با سوسپانسیون سلولی و با استفاده از هموسیتومتر تعیین شد. از سوسپانسیون‌های سلولی با درصد زنده بودن بالاتر از ۹۰ درصد برای انجام تست‌ها استفاده شد.

تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره متانلی

ابتدا غلظت اولیه ۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین تهیه شد و با عبور دادن از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد. از آنجایی که عصاره متانلی تهیه شده محلول در آب بود، لذا غلظت‌های مختلف عصاره متانلی (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت تهیه شد. تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به‌صورت گروه‌های مختلف تیمار و شاهد به مدت ۷۲ ساعت دیگر انکوبه شدند به‌طوری‌که برای هر گروه سه چاهک اختصاص داده شد و آزمایش سه بار تکرار گردید. در گروه‌های تیمار، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره از غلظت پایین تا غلظت بالا (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. در گروه شاهد منفی، سلول‌ها تنها همراه محیط کشت DMEM، FCS ۱۰٪، ۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین انکوبه شدند.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از تست رنگ سنجی ام‌تی‌تی (MTT):

به‌منظور بررسی تأثیر عصاره متانلی *Artemisia annua* بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی کشت داده شده از روش رنگ سنجی ام. تی. تی (MTT) استفاده شد (۲۴). اساس این تست شکستن نمک تترازولیوم

ام.تی.تی توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است و در نتیجه این فعالیت بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ ایجاد می‌شود که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بعد از ۷۲ ساعت تیمار سلولی، ۲۵ میکرولیتر از محلول ام. تی. تی (از شرکت سیگما با غلظت ۵ میلی گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین) 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 شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و بلورهای تشکیل شده در ته چاهک‌ها به‌طور کامل حل شدند. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نوری (OD) هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد. نتایج حاصله به‌صورت درصد مهار رشد سلولی گزارش شد. درصد مهار رشد سلولی با فرمول زیر محاسبه گردید:

100 × (شاهد OD / تیمار OD) -1= درصد مهار رشد سلولی

نتایج حاصل از درصد مهار رشد سلول‌ها در گروه‌های مختلف تیمار با گروه شاهد توسط آزمون آماری Paired sample t – test به‌منظور مقایسه میانگین داده‌های گروه کنترل با هر یک از گروه‌های تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری مقدار $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

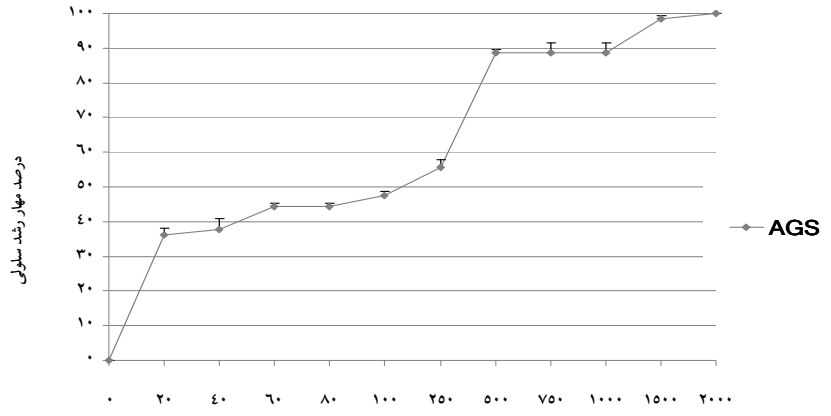
تأثیر عصاره متانلی *Artemisia annua* بر رشد سلولی

درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS) بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره متانلی *Artemisia annua* به‌ترتیب ۹/۱±۳۶، ۳/۰±۳۷/۷، ۱/۱±۴۴/۲، ۱/۱±۴۴/۲، ۱/۱±۴۷/۵، ۱/۹±۵۵/۷، ۱/۱±۸۸/۵ ، ۳/۰±۸۸/۵ ، ۱/۱±۹۸/۳و ۲/۵±۱۰۰ درصد بود. در مقایسه، تمام غلظت‌های مورد بررسی عصاره متانلی سبب مهار وابسته به غلظت تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی AGS شدند و در مقایسه با گروه شاهد منفی بدون تیمار (غلظت صفر عصاره)، میزان مهار رشد سلولی توسط تمامی غلظت ها تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱، نمودار۱). مهار رشد سلول های سرطانی سرویکس (Hela) تیمار شده به ترتیب ۰/۹±۲/۰، ۱/۰±۴/۴، ۱/۱±۴/۸، ۰/۳±۹/۷، ۰/۶±۲۵/۷، ۱/۰±۲۷/۷، ۲/۴±۸۲/۴، ۰/۸±۸۵/۷، ۱/۳±۸۸/۵، ۱/۲±۸۹/۷، ۰/۸±۹۱/۰ درصد بود. غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی در مقایسه با شاهد سبب مهار معنی‌دار رشد سلول‌های سرطانی Hela نشدند ولی غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از آن رشد سلولی را در مقایسه با گروه شاهد به میزان معنی‌داری کاهش دادند (جدول ۱، نمودار۲). درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره متانلی *Artemisia annua* به ترتیب ۰/۲±۰، ۰/۲±۰، ۰/۲±۰، ۰/۲±۰، ۰/۲±۰/۵، ۱/۲±۲/۱، ۱/۰±۳۵/۹، ۱/۰±۷۲/۳، ۰/۶±۷۶/۴، ۰/۶±۸۶/۵ ، ۰/۴±۹۱/۹ و ۰/۲±۹۴/۶ درصد بود. غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ ، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی در مقایسه با شاهد سبب مهار معنی‌دار رشد سلول‌های سرطانی HT-29 نشدند ولی غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از آن رشد سلولی را در مقایسه با گروه شاهد به میزان معنی‌داری کاهش دادند (جدول ۱، نمودار۳).غلظت‌های مورد بررسی عصاره متانلی *Artemisia annua* سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) به‌ترتیب به میزان ۲/۳ ±۲۶/۲، ۱/۲ ±۲۹/۰، ۰/۷±۲۸/۸، ۲/۰±۳۵/۵، ۲/۵±۴۲/۴، ۰/۹±۶۷/۰، ۱/۵±۸۳/۵، ۰/۶±۸۸/۶، ۰/۹±۹۰/۶، ۰/۸±۹۲/۰ و ۰/۱±۹۳/۴ درصد شدند. تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با تمامی غلظت‌های عصاره متانلی *Artemisia annua* سبب مهار قابل توجه رشد سلولی

شد (جدول ۱، نمودار۴). درصد مهار رشد سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی (L929) بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره متانلی *Artemisia annua* به ترتیب ۰±۰/۳، ۰/۸±۰/۷، ۰/۸±۰/۶، ۰/۸±۰/۴، ۰/۸±۰/۵، ۲/۱±۰/۴، ۴۲/۵±۰/۳، ۷۲/۳±۰/۷، ۹۱/۶±۰/۳، ۹۱/۶±۰/۳ و ۹۱/۶±۰/۳ درصد بود. تیمار سلول‌های L929 با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی در مقایسه با شاهد سبب مهار معنی‌دار رشد سلولی نشد ولی غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از آن رشد سلولی را در مقایسه با گروه شاهد به میزان معنی‌داری کاهش دادند (جدول ۱، نمودار۵).

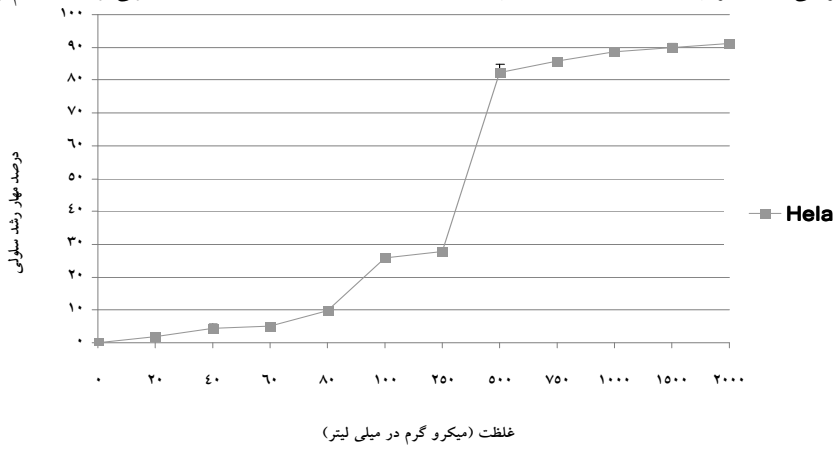
جدول ۱. *تأثیر کشندگی غلظت‌های مختلف عصاره متانلی Artemisia annua به صورت درصد مهار رشد سلولی (برحسب میانگین±S.E) بر سلول‌های سرطانی وطبیعی*

رده سلولی / غلظت (میکروگرم‌درمیلی‌لیتر)	AGS		Hela		HT-29		MCF-7		L929	
	مهاررشدسلولی	مقدارp	مهاررشدسلولی	مقدارp	مهار رشد سلولی	مقدارp	مهار رشد سلولی	مقدارp	مهار رشد سلولی	مقدارp
۰ (کنترل)	۰	-	۰	-		-	۰	-	۰	-
۲۰	۳۶±۹/۱	۰/۰۴۶	۲/۰±۰/۹	۰/۵۰۷	۰	۱/۰	۲۶/۲±۲/۳	۰/۰۴۶	۰	۱/۰
۴۰	۳۷/۷±۳/۰	۰/۰۶۲	۴/۴±۱/۰	۰/۴۹۱	۰	۱/۰	۲۹/۰±۱/۲	۰/۰۵۰	۰/۸±۰/۷	۰/۹۸۸
۶۰	۴۴/۲±۱/۱	۰/۰۴۳	۴/۸±۱/۱	۰/۴۹۷	۰	۱/۰	۲۸/۸±۰/۷	۰/۰۷۴	۰/۸±۰/۶	۱/۰
۸۰	۴۴/۲±۱/۱	۰/۰۳۷	۹/۷±۰/۳	۰/۰۸۰	۰/۵±۰/۲	۰/۳۵۳	۳۵/۵±۲/۰	۰/۰۲۶	۰/۸±۰/۴	۰/۹۹۹
۱۰۰	۴۷/۵±۱/۱	۰/۰۲۳	۲۵/۷±۰/۶	۰/۰۲۳	۲/۱±۱/۲	۰/۱۵۴	۴۲/۴±۲/۵	۰/۰۱۲	۰/۸ ±۰/۵	۱/۰
۲۵۰	۵۵/۷±۱/۹	۰/۰۰۹	۲۷/۷±۱/۰	۰/۰۱۰	۳۵/۹±۱/۰	۰/۰۲۴	۶۷/۰±۰/۹	۰/۰۰۶	۲/۱±۰/۴	۰/۹۹۹
۵۰۰	۸۸/۵±۱/۱	۰/۰۰۴	۸۲/۴±۲/۴	۰/۰۰۵	۷۲/۳±۱/۰	۰/۰۰۸	۸۳/۵±۱/۵	۰/۰۰۳	۴۲/۵±۰/۳	۰/۳۳۵
۷۵۰	۸۸/۵±۳/۰	۰/۰۰۲	۸۵/۷±۰/۸	۰/۰۰۲	۷۶/۴±۰/۶	۰/۰۰۳	۸۸/۶±۰/۶	۰/۰۰۲	۷۲/۳±۰/۷	۰/۰۷۹
۱۰۰۰	۸۸/۵±۳/۰	۰/۰۰۱	۸۸/۵±۱/۳	۰/۰۰۱	۸۶/۵±۰/۶	۰/۰۰۲	۹۰/۶±۰/۹	۰/۰۰۱	۹۱/۶±۰/۳	۰/۰۲۲
۱۵۰۰	۹۸/۳±۱/۱	۰/۰۰۱	۸۹/۷±۱/۲	۰/۰۰۱	۹۱/۹±۰/۴	۰/۰۰۱	۹۲/۰±۰/۸	۰/۰۰۱	۹۱/۶±۰/۳	۰/۰۰۸
۲۰۰۰	۱۰۰±۲/۵	۰/۰۰۱	۹۱/۰±۰/۸	۰/۰۰۱	۹۴/۶±۰/۲	۰/۰۰۱	۹۳/۴±۰/۱	۰/۰۰۱	۹۱/۶±۰/۳	۰/۰۰۳



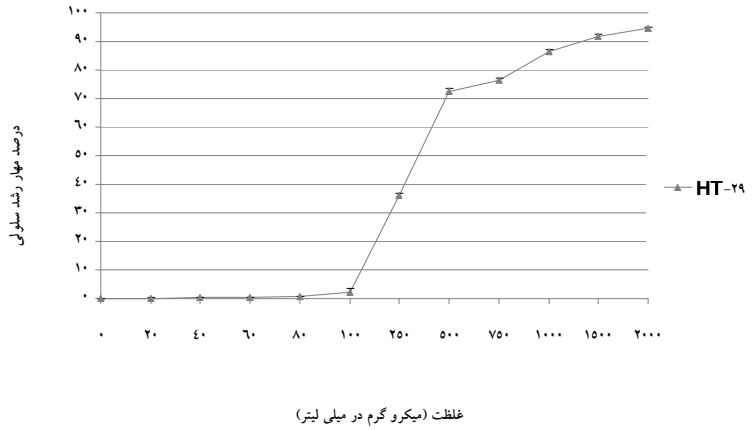
نمودار ۱. *درصد مهار رشد سلول‌های AGS تیمار شده با عصاره متانلی Artemisia annua*

سلول‌های سرطانی AGS همراه با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام.تی.تی گزارش شد.



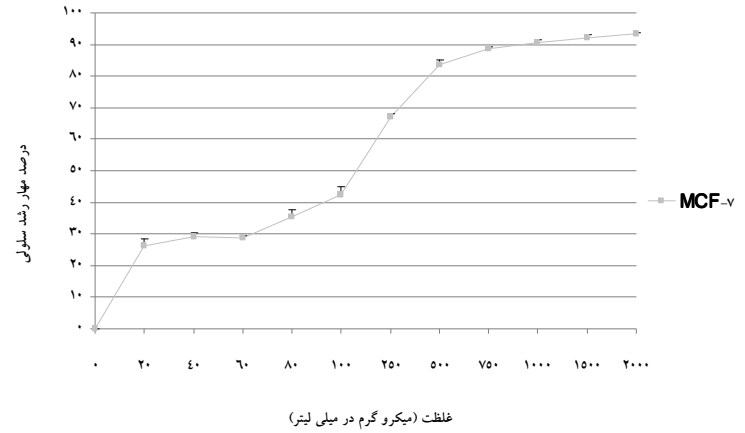
نمودار ۲. *درصد مهار رشد سلول‌های Hela تیمار شده با عصاره متانلی Artemisia annua*

سلول‌های سرطانی Hela همراه با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام. تی. تی گزارش‌شد.



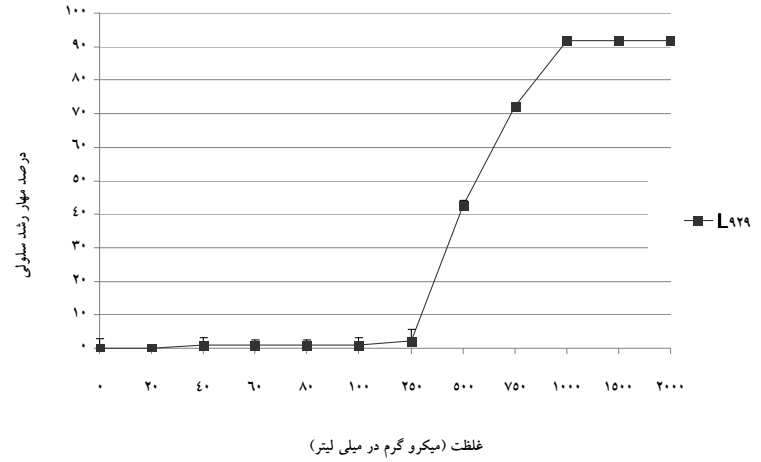
نمودار ۳. *درصد مهار رشد سلول‌های HT- 29 تیمار شده با عصاره متانلی Artemisia annua*

سلول‌های سرطانی HT-29 همراه با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام. تی. تی گزارش‌شد.



نمودار ٤. *درصد مهار رشد سلول‌های MCF- 7 تیمار شده با عصاره متانلی Artemisia annua*

سلول‌های سرطانی MCF-7 همراه با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام. تی. تی گزارش‌شد.



نمودار ۵. *درصد مهار رشد سلول‌های L929 تیمار شده با عصاره متانلی Artemisia annua*

سلول‌های فیروبلاستی طبیعی L929 همراه با غلظت‌های مختلف عصاره به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و درصد مهار رشد سلولی توسط تست ام.تی.تی گزارش شد.

بحث

با توجه به عدم پاسخ مطلوب سرطان ها بـه درمـان و پیشرفت سریع آن، تحقیق در زمینه تولیـد داروهـایی بـا کارایی بیشتر و سمیت کمتر ادامه دارد. ترکیبات گیاهی بسیاری با اثرات بیولوژیکی متنوع وجود دارند که بخشی از داروهای ضد سرطانی را در علم داروسازی نوین شامل می‌شوند (۶-۱). از این میان، اعضای خانواده گیاه آرتمیزیا گیاهان دارویی مهمی در سرتاسر دنیا محسوب می‌شوند و تأثیر سمیت سلولی بسیاری از گونه‌هـای ایـن گیـاه بـر رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است (۱۶-۷). اثرات بیولوژیک *Artemisia annua* نیز از دیرباز مورد توجه بوده و امروزه ترکیبات مختلفـی از آن جـدا شـده و اثـرات بیولـوژیکی آنهـا مـشخص شـده اسـت. غلظـت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اسانس جدا شـده از *Artemisia annua* سبب القای آپوپتوز در سلول‌های هپاتوکارسینومای SMMC-7721 شده است (۱۷). آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شده از *Artemisia annua* نیز در شـرایط بـرون تنـی کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی از جمله رده سلولی هپاتوکارسـینوما داشـته و از ایجـاد سـرطان پـستان در رات‌های تیمار شده با ماده سرطان‌زای DMBA جلوگیری می‌کند (۱۹). آرتمیزینین (Artemisinin) علاوه بر تـأثیر ضد مالاریایی علیه سرطان‌های مختلف از جمله لوسمی و

سرطان کولون موثر است (۲۰). آرتزونیت (Artesunate) مهمترین مشتق آرتمیزین است که بیشتر از آن محلول در آب بوده و تأثیر ضد مالاریایی بیشتری نیز دارد. در یک مطالعه گزارش شد که آرتزونیت تأثیر آنتی‌آنژیوژنیک داشته و علاوه بر اثر ضد سرطانی، تولید فاکتور رگزایی VEGF را نیز در سلول‌های K562 مهار می‌کند (۲۱). آرتزونیت سبب القای آپوپتوز سلولی در سلول‌های اندوتلیال جلدی انسانی نیز می‌شود (۲۲). ترپنوئیدها و فلاوونوئیدهای دیگری نیز از *Artemisia annua* جدا شده‌اند که تأثیر کشندگی بر سلول‌های سرطانی HT-29، A549، MCF-7، P-388 و KB دارند (۲۳). با توجه به اینکه با گذشت زمان زیاد هنوز هم اثرات دارویی گیاه *Artemisia annua* مورد توجه محققان قرار دارد و ترکیبات مختلفی با خاصیت ضد سرطانی از آن جداسازی شده است، در این تحقیق نیز تأثیر عصاره متانلی این گیاه بر رشد سلول‌های سرطانی مختلف برای اولین بار بررسی شد.

به‌منظور یافتن ترکیبات گیاهی ضد سرطانی قوی و بی‌خطر از میان گیاهان بومی کشور، در این تحقیق تأثیر کشندگی عصاره متانلی جدا شده از *Artemisia annua* رشد کرده در ایران بر سلول‌های سرطانی مختلف و سلول‌های فیبروبلاستی طبیعی توسط تست ام. تی. تی ارزیابی شد. بر طبق نتایج حاصله (جدول ۱، نمودارهای ۱ تا ۵)، تیمار سلول‌های سرطانی بعد از ۷۲ ساعت با غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی *Artemisia annua* سبب مهار وابسته به غلظت تکثیر و بقای سلولی شد. مقایسه میزان مهار رشد سلول‌های مورد بررسی تیمار شده با غلظت یکسانی از عصاره متانلی *Artemisia annua* نشان داد که غلظت‌های ۲۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر مهاری را به ترتیب بر رده‌های سلولی AGS، MCF-7، Hela، HT-29 و L929 دارند. غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بیشترین تأثیر مهاری را بر MCF-7، AGS، HT-29، Hela و L929 داشت. غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بیشترین تأثیر مهاری را بر AGS، MCF-7، Hela، HT-29 و L929 نشان داد. غلظت ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بیشترین تأثیر مهاری را بر رده‌های سلولی MCF-7، AGS، Hela، HT-29 و L929 گذاشت. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بالاتر از عصاره متانلی *Artemisia annua* تأثیر مهاری بالایی (بیشتر از ۸۵ درصد) بر تمام رده‌های سلولی مورد بررسی داشت و میزان مهار رشد سلول‌های مختلف تیمار شده نزدیک به‌هم بود. در تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، اگرچه مهار رشد تمام سلول‌ها بسیار بالا بود ولی مهار ۱۰۰ درصد رشد سلولی تنها در رده سلولی سرطانی معده (AGS) دیده شد. در مقایسه، حساس ترین سلول‌ها به کمترین غلظت عصاره (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به ترتیب رده‌های سلولی سرطان معده (AGS)، پستان (MCF-7)، سرویکس (Hela)، کولون (HT-29) و در آخر سلول‌های طبیعی L929 بودند.

مهار رشد سلول‌های رده سرطان کبد(SMMC-7721) کولون (SW-116 و LoVo)، مری (CaEs-17) و معده (BGC-823) توسط غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانلی *Artemisia annua* تا ۷۰ درصد گزارش شده و از آنجایی که میزان مهار رشد سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی بسیار کمتر از عصاره اتانلی بوده این طور استنتاج گردیده که ترکیبات موثره این گیاه عمدتا در عصاره اتانلی حضور دارند (۱۸). در مقایسه نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر با گزارش مذکور، غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانلی *Artemisia annua* بررسی شده در مطالعه حاضر بیشتر از تأثیر غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانلی در پژوهش ذکر شده سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شد. از آنجاییکه محدوده درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی در گزارش قبلی بین ۵۱ تا ۷۰ درصد بود ولی این محدوده در تحقیق حاضر بالاتر از ۸۵ درصد بود، بنابراین عصاره متانلی بررسی شده در این تحقیق تأثیر مهاری قابل توجه تری بر سلول‌های سرطانی دارد. ما نیز در این تحقیق همانند گزارش قبلی به این نتیجه رسیدیم که عصاره محلول در الکل *Artemisia annua* مواد موثره ضد سرطانی

دارد. بنابراین جداسازی ترکیبات قطبی موجـود در ایـن عصاره می‌تواند ترکیبات موثره جدیدی را معرفی نمایـد. نتایج این تحقیق همچنین حساسیت متفاوت سـلول‌هـای سرطانی مختلف را به عصاره متانلی *Artemisia annua* نشان داد. سلول‌های سرطانی معده (AGS) و پستان (MCF-7) نیز بیشترین حساسیت را به این عصاره نشان دادند. مهار رشد تمامی سلول‌ها در غلظت‌های بالای ۱۰۰۰ میکروگـرم و بالاتر بیش از ۸۵ درصد بود که حاکی از تـأثیر مهـاری قوی این عصاره می‌باشد.

این مطالعه تأثیر ضد توموری عصاره متانلی *Artemisia annua* را بر سلول‌های سرطانی مختلف به‌ویژه سلول‌های سرطان معده نشان داد. هم‌چنین کشندگی کمتر این عصاره بر سلول‌های طبیعی مشخص گردید. بنابراین می‌توان تأثیر این عصاره را به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی و بی خطر بر مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی توموری بررسی کرد. انجام مطالعات تکمیلی به منظور جداسازی ترکیبات موثره در این عصاره و بررسی اثر آنها بر رشد سلول‌های سرطان معده پیشنهاد می‌شود

Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* Methanol Extract on Cancer Cell Lines *in Vitro*

Emami A., Ph.D.[1], Zamani Taghizadeh Rabe Sh., M.Sc.[2], Ahi A., B.Sc.[3], Mahmoudi M., Ph.D.[4*]

1. Associate Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2. Master of Science in Immunology, Immunology Research Center, BuAli Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Researcher, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Professor of Immunology, Immunology Research Center, BuAli Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Corresponding author, e-mail: mahmoudim@mums.ac.ir

(Received: 1 August 2009 Accepted: 6 Jan 2010)

Abstract

Background & Aims: In most cases, drugs used for the treatment of cancer are not effective or have unpleasant side-effects. This has forced scientists to find more effective drugs with less toxicity. *Artemisia* is an important medicinal plant in the world and anti-tumoral activity of some *Artemisia* species has been reported. This study was designed for evaluation of anti-tumoral effect of methanol extract isolated from *Artemisia annua* on different cancer cell lines.

Methods: Methanol extract of *Artemisia annua* was prepared. Cultivated gastric (AGS), cervix (Hela), colon (HT-29) and breast (MCF-7) cancer cell lines and normal fibroblast cells (L929) were incubated with different concentrations of methanol extract for 72 hours and cell growth inhibition was determined using MTT assay.

Results: Results of MTT assay showed strong and dose-dependent inhibition of cancer cell growth by methanol extract of *Artemisia annua*. This extract caused a significant decrease in proliferation of tested cancer cell lines and had less toxicity on normal cells.

Conclusion: Since the results suggest anti- tumoral activity of *Artemisia annua*, isolation of effective compound/s of this extract and evaluation of its/their effects on tumor-bearing animal models are suggested.

Keywords: *Artemisia annua*, Tumor cell lines, Growth inhibitors, MTT assay

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(3): 215-225

References

1. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. *J Nat Prod* 2003; 66(7): 1022-37.
2. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja PS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem* 2005; 13(21): 5892-5908.
3. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.
4. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68(1): 29–43.
5. 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; 92(3): 999-1002.
6. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogen* 1998; 19(4): 611-6.
7. Podlech D. In: Rechinger K.H. (editor) Flora Iranica Akademische Druck-u. Verlagsansalt, Graz, 1986; pp159-223.
8. Ghahreman A, Attar F. Biodiversity of plant species in Teheran. Tehran University Publication, 1999; pp 41-2 [Persian].
9. Emami SA, Aghazari F. Les Phanerogames endemiques de la flore d' Iran. Iran, Téhéran, Publication de l' Universiteâ€² d' Iran des Sciences Medicales, 2008; p 349 [French].
10. 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; 98(3): 339–43.
11. 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; 69(3): 218-22.
12. Seo HJ, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Mut Res* 2001; 496(1-2): 191-8.
13. 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; 68(6): 1081–7.
14. 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.*Cancer Sci* 2000; 91(1): 113-7.
15. 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; 27(7): 1106-11.
16. 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; 140 (1): 37-45.

17. 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; 35(3): 337-9.

18. 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; 21: 1102-4.

19. 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; 231(1): 43-8.

20. Baldi A, Dixit VK. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Tech* 2008; 99(11): 4609-14.

21. 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; 47(2-3): 131–8.

22. 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; 211(2): 163–73.

23. Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta* Medica 1994; 60 (1): 54-7.

24. Mosmann T. Rapid colorometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65 (1-2): 55-63.