

## اثر اسانس *Artemisia herba alba* بر بیان ژن های ADA و ODC1 در سلول های سرطان پستان انسانی رده MCF-7

هما هراتی، M.Sc.، فاطمه سعید نعمت پور، Ph.D.\*

- دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، نیشاپور، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: fnematpour@iau-neyshabur.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵

### چکیده

**هدف:** هدف از این پژوهش اثر اسانس گیاه *Artemisia herba alba* بر درصد زنده‌مانی و بیان ژن‌های ODC1 و ADA در رده سلول‌های سرطان پستان انسانی MCF-7 است.

**مواد و روش‌ها:** اسانس گیاه *A. herba alba* با استفاده از کلونجر گرفته شد. اجزا اسانس توسط دستگاه GC-Mass آنالیز شد. رده سلولی MCF-7 تحت تاثیر غلظت‌های افزایشی اسانس از ۰/۰۱ تا ۰/۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت. سپس سمیت سلولی اسانس به روش رنگ‌سنجی MTT بررسی و بیان ژن‌های ODC1 و ADA با روش Real-time PCR سنجیده شد.

**نتایج:** بیش‌ترین ترکیبات اسانس شامل Comphor، Chrysanthenyl Acetate و Davanone بودند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس سمیت سلولی به‌طور قابل توجه افزایش پیدا می‌کند و پارامتر IC50 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ۰/۰۱۸۵۸، ۰/۰۱۷۵۱ و ۰/۰۱۷۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. به‌علاوه در غلظت ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسانس بیان ژن ODC1 و ADA به ترتیب ۲ و ۱/۵ برابر نمونه کنترل کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد سمیت سلولی اسانس گیاه *A. herba alba* که در این تحقیق مشاهده شد نتیجه کاهش بیان ژن‌های ODC1 و ADA در سلول‌های سرطان پستان انسانی رده سلولی MCF-7 باشد.

**واژگان کلیدی:** اورنیتین دکربوکسیلاز، آدنوزین دآمیناز، زنده‌مانی، سمیت سلولی

## مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع ترین سرطان های عصر حاضر به خصوص در بین بانوان است و براساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت، از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر دچار سرطان پستان می شود. این بیماری سهم حدود ۲۵ درصدی از کل بدخیمی ها را به خود اختصاص داده و باعث ۳/۳ مرگ از هر صد هزار نفر می شد (۱).

پژوهش های گسترده ای جهت شناسایی ژن های دخیل در سرطان پستان صورت گرفته است که از مهم ترین آن ها می توان به ژن های ODC1 و ADA اشاره کرد. اورنیتین دکربوکسیلاز آنزیمی است که در انسان توسط ژن ODC1 رمزگذاری می شود و یک آنزیم دایمیریک است (۲). آنزیم ODC1 نیاز به فسفات پیریدوکسال به عنوان کوفاکتور و عوامل کاهش دهنده گروه تیوول برای فعالیت دارد. احتمالاً به دلیل وجود تعداد زیاد مخازن سیستئین، پروتئین ODC1 حاوی دو PEST (غنی از پرولین، گلوتامات، سرین و ترئونین) است (۳). ژن ODC1 شامل سه منطقه CACGTG است: یکی در منطقه ۵ پروموتور و دو تای دیگر در اینترون ۱ که محصول پروتئین انکوژن c-Myc به آن متصل می شود (۴). بیان بیش از حد c-Myc و دیگر انکوژن هایی مانند Ha-ras، v-Mos و c-Fos می تواند منجر به بیان بیش از حد و القا ODC و در نهایت سرطان زایی شود (۵). افزایش فعالیت ODC یکی از تغییرات اولیه مشاهده شده در سلول های تحریک شده برای رشد است و این افزایش تغییرات چندین ساعت زودتر از سنتز DNA اتفاق می افتد که ODC را به عنوان یک ژن پاسخ سریع معرفی می کند (۶).

آدنوزین دامیناز آنزیمی است که دامیناسیون آدنوزین یا دئوکسی آدنوزین را به اینوزین کاتالیز می کند و در متابولیسم پورین ها شرکت می کند که نقش مهمی در توسعه سیستم ایمنی بدن و بلوغ سلول های پستانداران دارد (۷، ۸) با توجه به برگشتناپذیری واکنش کاتالیز شده توسط ADA، به نظر می رسد که این واکنش یکی از مراحل محدود کننده میزان تجزیه آدنوزین باشد (۹). در مطالعات متعدد، فعالیت ADA در بافت ها و سلول های سرطانی افزایش یا کاهش نشان می دهد. اکثر این مطالعات بر روی فعالیت آنزیمی در بافت ها یا سلول های سرطانی و هم چنین بافت طبیعی متمرکز شده است (۱۰). هم چنین مطالعات اخیر نشان می دهد که سطح آنزیم ADA در سلول های سرطانی پستان در مقایسه با سلول های طبیعی افزایش می یابد (۱۱، ۱۲). بنابراین، کاهش بیان ژن ODC و ADA و فعالیت آنزیم های مربوطه می تواند یک راه حل مناسب برای درمان و پیش گیری سرطان پستان باشد (۱۳). امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته اند و اثرات درمانی محصولات طبیعی فراوانی علیه انواع سرطان ها، به اثبات رسیده است (۱۴). *Artemisia*، گیاهی است بوته ای و از خانواده کاسنی ها که دارای برگ و گلی معطر و خاصیت دارویی است (۱۵). به طور کلی ترکیبات شیمیایی موجود در جنس *Artemisia* را می توان به گروه مونوترپن ها، سزکویی ترپن ها و به ویژه سزکویی-ترپن لاکتون ها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، پلی استیلن ها و کومارین ها طبقه بندی نمود (۱۶). ترکیبات Davanone D، Linalool و Eucalyptol بیشترین ترکیباتی هستند که در گیاه *Artemisia herba alba* وجود دارند (۱۷). این گیاه دارای خواصی از جمله آنتی باکتریال، ضدقارچی، ضددیابت، ضدآلرژی، ضدالتهاپی، آنتی اکسیدانت و فعالیت ضدتوموری و ضدسرطان هست (۱۸). در این پژوهش علاوه بر اثر سمیت سلولی سطح بیان ژن های ODC1 و ADA نیز مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**تهیه اسانس:** گیاه *A. herba alba* در فصل بهار از منطقه عطائیه نیشابور ایران جمع‌آوری شده و توسط آقای دکتر طاهری شناسایی و نمونه هرباریومی این گیاه در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور نگهداری می‌شود. اسانس‌گیری از سرشاخه‌های برگ‌دار خشک این گیاه توسط دستگاه کلونجر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت و نیم انجام شد. سپس اسانس با حلال آلی N-Hexane جمع‌آوری شد و برای حذف حلال و تغلیظ آن به مدت ۳۰ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و پس از حذف حلال به فریزر ۲۰- منتقل شد (۱۸). در این پژوهش از غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۱۵، ۰/۰۲، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس استفاده شد. برای تهیه این غلظت‌ها از ۰/۰۵ درصد DMSO استفاده شد.

**شناسایی ترکیبات اسانس:** تعیین ترکیبات اسانس با دستگاه GC-Mass (Agilent Technologies, USA) و ستون DB35MS، تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه و سپس در هر دقیقه ۳ درجه سانتی‌گراد افزایش تا دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و در انتها برای ۵ دقیقه دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و جمعاً به مدت زمان ۵۳ دقیقه انجام پذیرفت. داده‌های حاصل از دستگاه با کتابخانه بین‌المللی ترکیبات آلی مقایسه شد و جدول ترکیبات اسانس گیاه *A. herba alba* به دست آمد (۱۹).

**رده سلولی و محیط کشت:** در این پژوهش از رده سلولی سرطان پستان MCF-7 استفاده شد. این سلول‌ها از آزمایشگاه کشت سلول دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شد و در فلاسک‌های ۲۵ در انکوباتور CO<sub>2</sub> ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد و همچنین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. با توجه به رشد سلول‌ها باید هر ۲۴ تا ۴۸ ساعت یکبار محیط درون فلاسک تعویض شود و هر ۳ الی ۴ روز پاساژ داده شوند.

**سنجش سمیت سلولی:** سمیت سلولی اسانس با استفاده از سنجش MTT مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و سپس اسانس گیاه در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌ها تاثیر داده شد. از غلظت ۵ میکرومولار داروی دوکسوروبیسین به عنوان کنترل جهت مقایسه استفاده شد. برای تعیین درصد سلول‌های زنده در هر غلظت اسانس، میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO تقسیم و در نهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. غلظت موثر عصاره دارای سمیت سلولی با کمیتی به نام IC<sub>50</sub> گزارش شد که نشان دهنده غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها زنده‌اند. برای محاسبه IC<sub>50</sub> اسانس از نرم‌افزار Prism 8.0 استفاده شد (۲۰).

**بررسی میزان بیان ژن‌های ODC1 و ADA:** برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، تیمار سلول‌های رده سلولی MCF-7 برای ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف اسانس با ۳ تکرار انجام شد. برای طراحی آغازگرهای مخصوص ژن ODC1 از توالی mRNA مربوط به این ژن که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی NM\_002539.2 وجود دارد، استفاده شد و برای طراحی آغازگرهای مخصوص ژن ADA از توالی mRNA مربوط به این ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI به شماره دسترسی NM\_000022.2 مورد استفاده قرار گرفت. طراحی آغازگر با شرایط استاندارد همانند طول آغازگر، دمای اتصال، تولید لوپ یا حلقه، G+C درصد، ایجاد دایمر، درون هر کدام از آغازگرها و ΔG با استفاده از نرم افزار Oligo بررسی شد و خصوصیات آن با استفاده از نرم افزارهای On-line مورد ارزیابی قرار گرفت. سنتز آغازگرهای طراحی شده با واسطه شرکت پیشگام، توسط شرکت متابیون (آلمان) انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای طراحی شده برای ژن های ODC1 و ADA

	نوع پرایمر	توالی	طول	درصد GC	دمای اتصال
<b>ADA</b>	پرایمر رفت	5'-ACCAGGCTAACTACTCGCTCAA-3'	۲۲	۵۰	۶۱,۱۵
	پرایمر برگشت	5'-TCAGTAAAGCCCATGTCCCGTT-3'	۲۲	۵۰	۶۱,۹۵
<b>ODC1</b>	پرایمر رفت	5'-GTGGGTGATTGGATGCTCTTTG-3'	۲۲	۵۰	۵۹,۸۳
	پرایمر برگشت	5'-AGGCCCTGACATCACATAGTAG-3'	۲۲	۵۰	۵۹,۰۳
<b>ACT</b>	پرایمر رفت	5'-TCCATCATGAAGTGTGACGT-3'	۲۰	۵۰	۶۰
	پرایمر برگشت	5'-GAGCAATGATCTTGATCTTCAT-3'	۲۲	۵۰	۶۰

مقایسه کمی بیان ژن های ODC1 و ADA با استفاده از روش Real-time صورت گرفت. cDNA ساخته شده از RNA استخراج شده از نمونه ها به عنوان الگو برای واکنش های qRT-PCR (کیت ها از شرکت پارس توس تهیه شد) تحت شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه و اسرشته سازی اولیه و سپس ۴۰ دور شامل ۳۰ ثانیه و اسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و پس از آن ۶۰ ثانیه القای دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای اتصال پرایمر و طویل شدن با پرایمرهای اختصاصی در نظر گرفته شد (۲۱).

### آنالیز آماری

برای تجزیه واریانس داده های مربوط به اثرات سمیت سلولی از نرم افزار SAS استفاده شد. Ct های مربوط به واکنش qRT-PCR از نرم افزار دستگاه Real time PCR استخراج و بعد از محاسبات پارامترهای مربوطه آنالیزهای آماری توسط این نرم افزار انجام شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون LSD استفاده شد و نمودارها به وسیله نرم افزار Prism 8.0 رسم شد.

### نتایج

#### ترکیبات اسانس گیاه *Artemisia herba alba*

ترکیبات گیاه *A. herba alba* شامل شماره پیک، نام ترکیب، مقدار این ترکیب به درصد کل اسانس، زمان شناسایی و احتمال شناسایی موفق ترکیب می باشد. بیشترین ترکیب موجود در اسانس *Davanone D* است که این ترکیب، ترکیب مخصوص جنس *Asteraceae* به حساب می آید. در این گیاه ترکیب *Davanone D* دارای ۱۲/۸۵ درصد از کل ترکیبات اسانس و ترکیب *Linalool* در اسانس ۱۲/۵۴ درصد هم چنین ترکیب *Eucalyptol* ۱۲/۱۷ درصد از ترکیبات این اسانس مختص این گیاه است. که در مجموع ۳۷/۵۶ درصد از مجموع ترکیبات اسانس متعلق به این سه ترکیب آلی می باشد (جدول ۲).

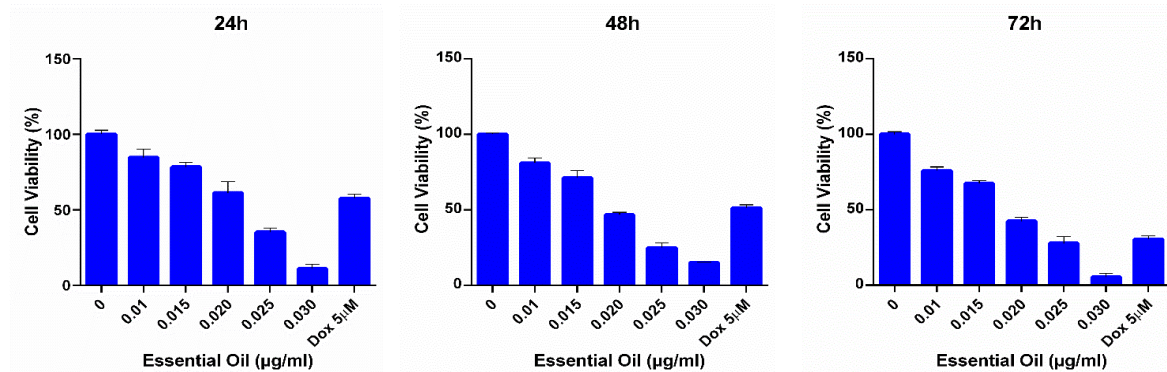
جدول ۲: ترکیبات گیاه *Artemisia herba alba* ترکیبات شامل شماره پیک، زمان شناسایی، مقدار این ترکیب به درصد کل اسانس، نام ترکیب و احتمال شناسایی موفق ترکیب می باشد. بیشترین ترکیبات شامل داونون، لینالول و اوکالیپتول می باشد که به رنگ تیره مشخص شده است.

PK .N	RT	% Area	Compound name	Qual
۱	۵/۹۳۱	۵/۱۳	Camphene	۹۵
۲	۶/۲۶۱	۴/۷۸	Decane	۸۹
۳	۸/۶۳	۱۲/۱۷	<b>Eucalyptol</b>	<b>۹۸</b>
۴	۱۲/۵۴۴	۱۲/۵۴	<b>Linalool</b>	<b>۹۷</b>
۵	۱۳/۵۰۶	۶/۵۱	Comphor	۹۸
۶	۱۵/۳۳۳	۹/۹۹	Cis-Chrysanthenyl Acetate	۸۰
۷	۱۸/۱۳۱	۳/۷۴	Geraniol	۹۳
۸	۱۹/۵۲۷	۲/۶	Alpha-Santalol	۸۱
۹	۲۰/۳۱۹	۳/۶۴	Z,E)-Alpha-Farnesene)	۸۰
۱۰	۲۱/۲۰۳	۶/۱۴	Davana Ether	۹۰
۱۱	۲۲/۰۲۷	۳/۴۴	H) Furanone $\delta$ ۲	۹۰
۱۲	۲۳/۲۴۹	۱۲/۸۵	Davanone D	۹۵
۱۳	۲۵/۰۰۹	۳/۱۸	Beta-Bisabolene	۸۲
۱۴	۲۵/۴۶۹	۶/۲۶	Alpha-Bisabolene	۸۳

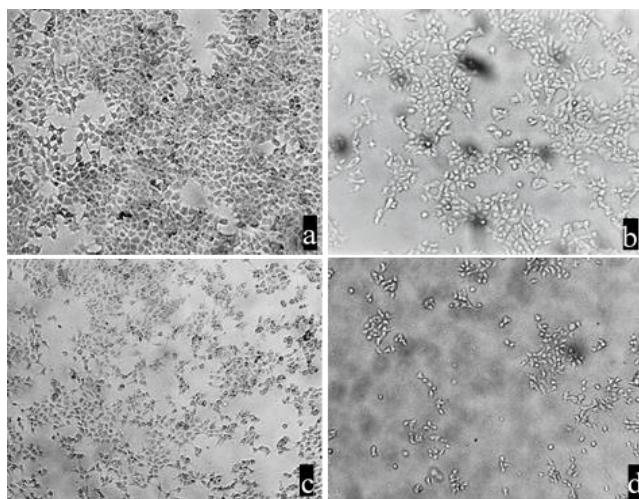
### اثرات سمیت سلولی اسانس

تیمار سلول های MCF-7 با غلظت های مختلفی از اسانس گیاه آرتیمیزیا ۰/۰۳۰ ، ۰/۰۲۵ ، ۰/۰۲۰ ، ۰/۰۱۵ ، ۰/۰۱۰ و صفر میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت ۵ میکرومولار داروی دوکسوروبیسین با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد که سمیت اسانس در غلظت های ۰/۰۲۰ ، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سیر نزولی خطی داشته است ولی در غلظت های بالاتر سمیت تشدید شده است، به طوری که در غلظت ۰/۰۲۵ و ۰/۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر سمیت به ترتیب ۲۵/۸۶ و ۵۰/۱۷ درصد افزایش یافته است و همچنین دوکسوروبیسین در بازه زمانی ۲۴ ساعت توانست ۵۷/۵۱ درصد سمیت را از خود نشان دهد. تیمار سلول ها در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز از روندی مشابه پیروی می کند (شکل ۱). به علاوه IC50 محاسبه شده در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر ۰/۰۲۱۰۴ ، ۰/۰۱۸۵۸ و ۰/۰۱۷۵۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

شکل طبیعی سلول های رده MCF-7 به صورت چندضلعی بوده و از تکثیر نسبتا بالایی برخوردار می باشند. تیمار سلول ها با غلظت های مختلف اسانس شکل ظاهری سلول ها را تحت تاثیر قرار داد. به طوری که با افزایش غلظت اسانس، سلول ها از حالت طبیعی خارج و پس از بیضی و کروی شدن، توانایی اتصال خود را از دست داده و شناور شدند (شکل ۲).



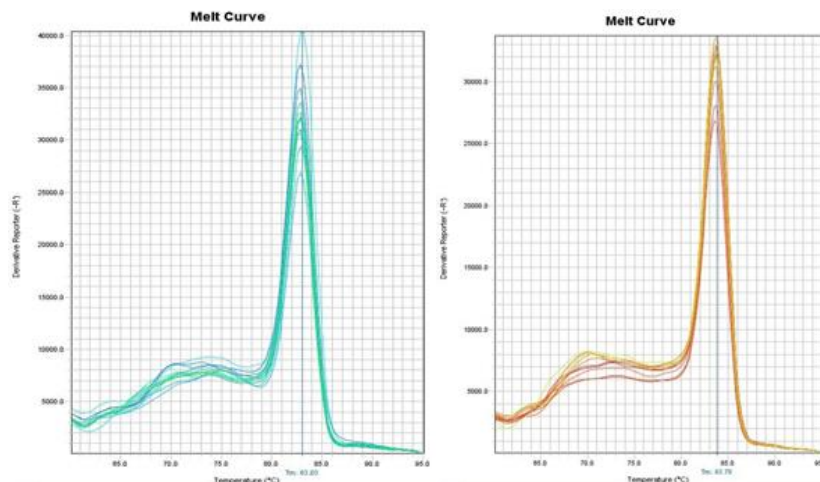
شکل ۱: درصد بقای سلول های MCF-7 در برابر غلظت های مختلف اسانس گیاه *Artemisia herba alba* و مقایسه با داروی دوکسوروبیسین در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده ها میانگین ۳ بار تکرار درصد زنده ماندن سلول ها در هر غلظت به همراه انحراف معیار می باشد.



شکل ۲: تصویر سلول های سرطان پستان انسانی رده MCF-7 پس از تیمار ۴۸ ساعت با غلظت های مختلف اسانس گیاه *A. herba alba*: (a) سلول ها پس از کشت، تثبیت و رشد اولیه. b: تیمار با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر اسانس. c: تیمار با غلظت ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر اسانس. d: تیمار با غلظت ۰/۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر اسانس (عدسی ۴).

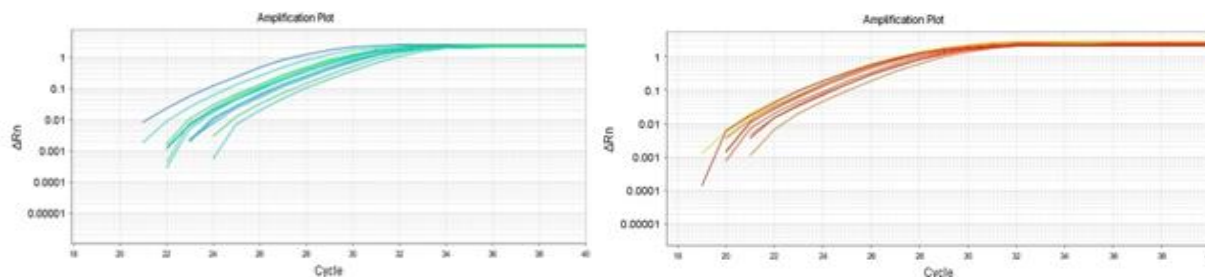
### اثر اسانس *A. herba alba* بر میزان بیان نسبی ژن های ODC1 و ADA

بعد از انجام Real-time PCR به دست آوردن دو نمودار فلورسانس و منحنی ذوب از اهمیت خاصی برخوردار است. که بر پایه Ct های گزارش شده و نمودارهای حاصله توسط دستگاه آنالیز داده ها صورت می پذیرد. نمودار تکثیر قطعات نشانگر افزایش فلورسانس تمامی نمونه ها طی مرحله لگاریتمی و رسیدن به ثبات نسبی است. در نمودار فلورسانس داشتن نمودارهای موازی نشانگر تکثیر قطعه مورد نظر در همه نمونه ها می باشد و هم چنین در منحنی ذوب اختصاصیت تکثیر با داشتن تنها یک پیک قابل استناد خواهد بود (شکل ۳).



منحنی ذوب ژن ADA

منحنی ذوب ژن ODC1



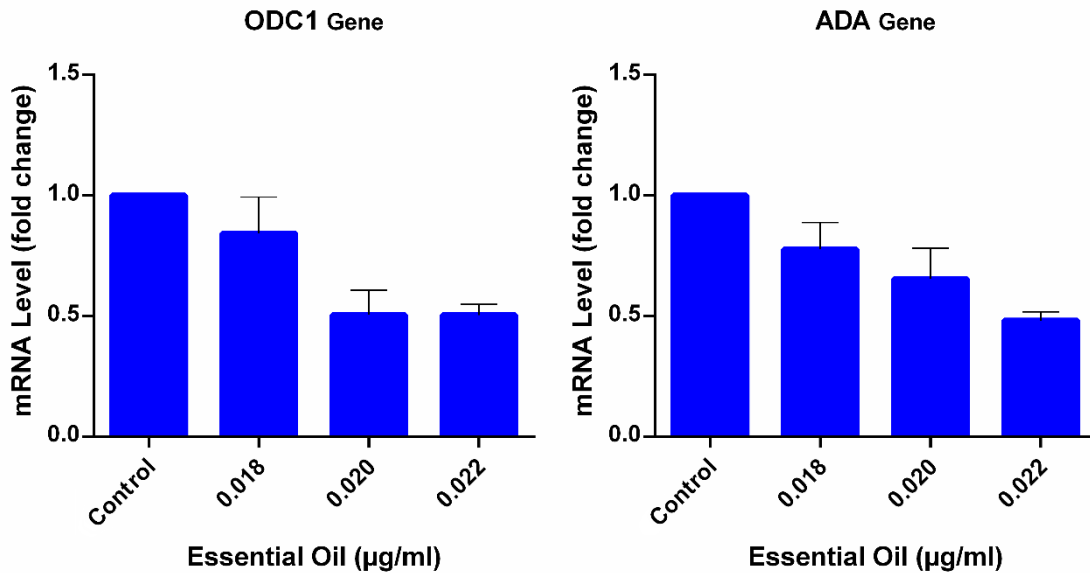
نمودار فلورسانس برای ژن ADA

نمودار فلورسانس برای ژن ODC1

شکل ۳: نمودارهای منحنی ذوب و فلورسانس پس از انجام qRT-PCR ژن هدف ODC1 و ADA و ژن مرجع GAPDH. وجود یک پیک در نمودار منحنی ذوب نشان دهنده تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر و وجود منحنی‌های موازی در نمودار فلورسانس حاکی از تکثیر قطعات در تمامی نمونه‌ها است.

### تغییرات بیان ژن‌های ADA و ODC1 در رده سلولی MCF-7

همان‌طور که در شکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد اسانس گیاه *A. herba alba* نسبت به نمونه کنترل باعث کاهش بیان ژن‌های ADA و ODC1 شد به طوری که در غلظت ۰/۰۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس بیان ژن ODC1 ۱/۲ برابر نمونه کنترل کاهش یافت و با افزایش به غلظت‌های ۰/۰۲۰ و ۰/۰۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش بیان ژن به ترتیب به ۲ و ۱/۹۸ برابر نمونه کنترل رسید. همچنین در غلظت‌های ۰/۰۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این اسانس بیان ژن ADA ۱/۳ برابر نمونه کنترل کاهش یافته و در غلظت‌های ۰/۰۲۰ و ۰/۰۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب به ۱/۵ و ۲/۱ برابر نمونه کنترل کاهش پیدا کرده است (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار بیان ژن ODC1 و ADA تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *Artemisia herba alba* در بازه زمانی ۴۸ ساعت. داده ها میانگین ۳ بار تکرار درصده زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه انحراف معیار می‌باشد.

#### بحث

داروهای گیاهی طی قرن‌ها در درمان انواع مختلف بیماری‌ها کاربرد داشته‌اند و بیش‌تر افراد این شیوه درمانی را به‌عنوان روشی جایگزین یا مکمل در نظر می‌گیرند که به‌آن کمک می‌کند تا وضعیت جسمی و روانی بهتری داشته باشند. به‌نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به‌ویژه گیاهان دارویی، سرآغاز مناسبی برای تدوین پروژه‌های تحقیقاتی، جهت دستیابی به داروهای نوین در درمان سرطان می‌باشد.

در همین راستا، در پژوهش حاضر اجزا اسانس گیاه *A. herba alba* شناسایی و سمیت سلولی اسانس آن بررسی شد. نتایج بیان‌گر آن بود که Eucalyptol، Linalool، Davanone D و بیش‌ترین ترکیباتی هستند که در اسانس این گیاه وجود دارند که جمعاً ۳۷/۵۶ درصد کل ترکیبات این اسانس را شامل می‌شوند. گونه‌های *Artemisia* در طبیعت بسیار گسترده‌اند که در درمان بیماری‌هایی مانند مالاریا، عفونت توسط قارچ‌ها و... مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه‌براین، برخی ترکیبات آن‌ها به‌عنوان حشره‌کش‌ها شناخته شده‌اند. در پژوهشی Tan (۱۹۹۸) به‌بررسی مواد فعال بیولوژیکی جنس *A. herba alba* پرداخت و گزارش کرد که برخی از ترکیبات این گیاه ضد مالاریا، ضد ویروس، ضد تومور، ضد تب، ضد هیپاتیت و ضد التهاب هستند (۲۲). در تحقیق دیگر در سال ۲۰۱۱ توسط Sharma و همکاران، Dehydro 1,8-cineole با ۲۲/۳۰ درصد و Camphor با ۲۲/۶۴ درصد و Davanone با ۱۲/۳۳ درصد ترکیبات اصلی اسانس گونه *Artemisia minor* معرفی (۱۹) که با نتایج تحقیق حاضر به‌ویژه در مورد Camphor با ۶/۵ درصد متفاوت است که می‌تواند به‌دلیل تفاوت در نوع گونه باشد. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Jaitak و همکاران انجام شده در دیگر گونه‌های جنس *Artemisia* ترکیبات cineol، thujone، monoterpens اجزای اصلی گزارش شدند در *A. maritima* ترکیبات آن شامل thujone با ۶۳/۲۵ درصد، sabinene با ۷/۸۳ درصد و cineole با ۶/۵۴ درصد جزو سه ترکیب اصلی به‌شمار می‌آیند (۲۳). در مطالعه‌ای بر روی ترکیب اسانس *A. herba alba* در جنوب تونس در بین صد ترکیب شناسایی شده ده مورد از آن‌ها به‌عنوان اجزای اصلی با غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد گزارش شدند (۲۴) که در



مقایسه با تحقیق حاضر ترکیبات مشترک شامل Comphor، Chrysanthenyl Acetate و Davanone هستند و تنها ترکیب مشترک بالای ۱۰ درصد Davanone با ۱۲/۵۸ است که این تفاوت می‌تواند به دلیل شرایط اکولوژی گیاهان مورد مطالعه باشد. همچنین در سال ۲۰۱۴ تحقیقی برای شناسایی ترکیبات اسانس *Artemisia japonica* صورت پذیرفت که در آن ترکیبات اصلی شامل Spathulenol، Germacrene D و  $\beta$ -elemene گزارش شد که با ترکیبات اصلی اسانس گیاه مورد بررسی در این تحقیق متفاوت بود (۲۵).

سمیت سلولی اسانس گیاه *A. herba alba* در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان IC<sub>50</sub> به ترتیب ۰/۰۲۱۰۴، ۰/۰۱۸۵۸، ۰/۰۱۷۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج نشان داد که اسانس این گیاه سمیت قابل توجهی برده MCF-7 دارد. Gordanian و همکاران (۲۰) طی تحقیقی سمیت سلولی پنج گونه *Artemisia* علیه سلول‌های MCF-7 و HEK293 مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار دادند. عصاره گل *A. absinthium* سمیت بالاتری در برابر سلول‌های MCF-7 با مقدار IC<sub>50</sub> ۲۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه ۴۸ ساعت نشان داد که IC<sub>50</sub> بالای به‌دست آمده در مقایسه با تحقیق حاضر به دلیل استفاده از عصاره به‌جای اسانس است. همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹، نتایج آزمایش سمیت سلولی برای غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گونه‌های *A. diffusa*، *A. sieberi*، *A. santolina* و *A. herba alba* در برابر سلول‌های Hep-2 و HepG-2 نشان حاکی از سمیت وابسته به‌غلظت همه عصاره‌های گونه‌های ذکر شده بر سلول‌های مورد مطالعه بود (۲۶). در تحقیق مشابه Tilaoui و همکاران (۲۷) با آنالیز اجزا اسانس *A. herba alba* و تاثیر آن بر سلول‌های سرطانی رده‌های P815 و BSR دریافتند که بیش‌ترین جز اسانس سزکوئی‌ترین‌های اکسیژن‌دار بوده و همین اجزا سبب سمیت سلولی برده‌های مورد مطالعه می‌شوند. براساس داده‌های مطالعات پیشین، به‌نظر می‌رسد که اثرات سمیت سلولی اسانس این گیاه به ترکیبات سزکوئی‌ترین مربوط باشد. بنابراین، نتایج ما در مورد رده سلولی MCF-7 حاکی از آن است که فعالیت سمیت سلولی اسانس *A. herba alba* ممکن است به سزکوئی‌ترین‌ها و همچنین سایر ترکیبات طبیعی موجود در اسانس مربوط باشد.

اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) از آنزیم‌های مهم در سنتز پلی‌آمین‌ها است و تجمع پلی‌آمین‌ها در انواع متعددی از سلول‌های سرطانی دیده شده است (۲۸). در نتیجه میزان فعالیت آنزیم ODC1 می‌تواند به‌عنوان شاخص زیستی در تخمین رشد و پیشرفت تومور در نظر گرفته شود. بنابراین کاهش میزان بیان ژن ODC1 و یا مهار فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز راه‌حل مناسب برای جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی است (۲۹). اخیراً استفاده از ترکیبات با منشا گیاهی یا عصاره‌های گیاهی در تحقیقات ضدسرطان و به‌ویژه در راستای کاهش پلی‌آمین‌ها و اورنیتین دکربوکسیلاز رو به‌فزونی گذاشته است. به‌طور مثال در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ بر اثر عصاره گیاه شیرین بیان بر بیان ژن ODC1 در سلول‌های سرطانی سینه انسانی نتایج حاکی از کاهش بیان ژن ODC1 و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی بود (۲۱). در تحقیقی دیگر اثر عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی روی رده سلولی MDA-MB-231 بررسی و مشخص شد که میزان بیان ژن ODC1 به‌طور وابسته به غلظت کاهش یافته است (۳۰). نتایج تحقیق حاضر در خصوص کاهش بیان ژن ODC1 با تحقیقات قبلی هم‌راستا است و در رابطه با مکانیسم این کاهش، فرضیه قوی این است که ترکیبات اسانس این گیاه سبب مهار رونویسی این ژن از طریق عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتوری هم‌چون توالی‌های متصل شونده به c-myc و AP-1 می‌شوند (۳۰).

در مورد بیان ژن ADA، آنزیم آدنوزین دامیناز (ADA) در متابولیسم پورین‌ها شرکت داشته و نقش اساسی در تکثیر و بلوغ سلول‌های پستانداران دارد و همچنین فعالیت آن در سلول‌های سرطان پستان افزایش می‌یابد. در طی مطالعه‌ای بر روی سرطان پستان به این یافته‌ها دست یافتند که با افزایش غلظت عصاره گیاه شیرین بیان درصد زنده ماندن سلول‌ها به ویژه در رده‌های سرطانی به طور معنی‌داری کاهش یافت و همچنین بیان ژن ADA در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره در رده‌های

MCF-7 و MDA-MB-231 به ترتیب به میزان ۴ و ۴/۸ برابر کاهش پیدا کرد (۳۱). همچنین در مطالعه‌ای، اثر چای سبز بر روی بافت معده و روده بزرگ انجام شد و مشخص شد در تمامی بافت‌ها پس از تیمار با عصاره چای سبز، فعالیت‌ها بهبود یافته است و بیان ژن ADA در بافت‌های سرطانی معده، کاهش یافته است (۳۲). در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که فعالیت ADA قبل از عمل در زنان بیمارسرطان پستان به طور قابل توجهی بالا بود و با پیشرفت سرطان پستان افزایش یافت بعد از برداشتن تومورها فعالیت ADA کاهش یافت (۱۲). مطالعه‌ای بر روی *Nepeta binaloudensis* نشان داد که قرارگیری سلول‌ها در معرض عصاره این گیاه به مدت ۴۸ ساعت باعث کاهش قابل توجهی در میزان بیان ژن ADA شده است (۳۰). در این تحقیق هم اسانس گیاه *A. herba alba* سبب کاهش بیان ژن ADA شد که با نتایج مطالعات فوق مطابقت دارد. به نظر می‌رسد که کاهش بیان آدنوزین دآمیناز باعث از بین رفتن مزیت سلول‌های سرطانی در به دست آوردن نوکلئوتیدهای بیش‌تر در سنتز و تکثیر DNA می‌شود.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق سمیت سلولی اسانس گیاه *A. herba alba* بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 و میزان نسبی بیان ژن‌های ODC1 و ADA مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده اثر سمیت سلولی اسانس این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 بود و این گیاه دارای ترکیباتی است که خاصیت ضدسرطانی دارد در نتیجه باعث کاهش بیان ژن‌های ODC1 و ADA در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با اسانس شده است. ترکیباتی که بیش‌ترین درصد اسانس را به خود اختصاص دادند شامل Eucalyptol, Linalool, Davanone D بودند. به علاوه اسانس این گیاه سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های موثر در سرطان پستان ADA و ODC1 شد که می‌تواند یکی از مکانیسم‌های باشد که سبب سمیت سلولی اسانس این گیاه بر سلول‌های سرطانی پستان می‌شود.

### منابع

1. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective, J herbmed pharmacol. 2018; 7(1):1-7.
2. Heby O. Ornithine decarboxylase as target of chemotherapy. Adv Enzym Regul. 1985; 24: 103-124.
3. Ghoda L, T van Daalen Wetters, M Macrae, D Ascherman, et al. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. Science. 1989; 243(4897): 1493-1495.
4. Tobias KE, Kahana C. Intersubunit location of the active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site-directed mutants. Biochemistry. 1993; 32(22): 5842-5847.
5. WALLSTRÖM EL, Takao K, Wendt A, Vargiu C, et al. Importance of the 3' untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA in the translational regulation of the enzyme. Biochem J. 2001; 356(2): 627-634.
6. Hayashi S-I, Murakami Y. Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. Biochem J. 1995; 306(Pt 1): 1-10.
7. Ri G, S Ohno, M Furutani, Y Furutani, et al. An indication for correlation between the serum ADA level and gastric cancer risk. Anticancer Res. 2010; 30(6): 2347-2349.
8. Roberts E, Roberts O. Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. British J Biomed Sci. 2012; 69(1): 11-13.

9. Garrod LP, O'Grady F. Antibiotic and chemotherapy. Antibiotic and chemotherapy. 1971(3rd Edition); ix, 546 p. illus.
10. Eroğlu A, Canbolat O, Demirci S, Kocaoğlu H, et al. Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol.* 2000; 17(4): 319-324.
11. Aghaei M, Karami-Tehrani F, Salami S, Atri M. Diagnostic value of adenosine deaminase activity in benign and malignant breast tumors. *Arch Medical Res.* 2010; 41(1): 14-18.
12. Mahajan M, Tiwari N, Sharma R, Kaur S, et al. Oxidative stress and its relationship with adenosine deaminase activity in various stages of breast cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2013; 28(1): 51-54.
13. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 83(3): 249-289.
14. Marhold K, Sklenář P. *Senecio imbaburensis*, proposed name for *Lasiocephalus sodiroi* in the genus *Senecio* (Asteraceae). *Phytotaxa.* 2013; 152(1): 59-60.
15. Alenazi MF, Sundberg MD. Phylogenetic Tree of *Artemisia* Species (*A. campestris*, *A. carruthii*, *A. dracuncululus*, *A. filifolia* and *A. ludoviciana*) in Kansas Based on Morphological and Anatomical Characteristics. *Trans Kans Acad Sci.* 2019; 122(1-2): 29-38.
16. Shen Q, Zhang L, Liao Z, Wang S, et al. The genome of *Artemisia annua* provides insight into the evolution of Asteraceae family and artemisinin biosynthesis. *Mol Plant.* 2018; 11(6): 776-788.
17. Tang HQ, Hu J, Yang L, RX Tan. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med.* 2000; 66(04): 391-393.
18. Younsi F, Trimech R, Boulila A, Ezzine O, et al. Essential oil and phenolic compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase, and antibacterial activities. *Int J Food Prop.* 2016; 19(7): 1425-1438.
19. Sharma V, Pathania VL, Singh B, Gupta RC. GCMS analysis and anti-microbial activity of essential oil of *Artemisia minor* Jacq. ex Bess. from Lahaul & Spiti (cold desert) region of north India. *Int. J. Drug Dev. Res.* 2011; 3(1): 127-139.
20. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Res Pharm Sci.* 2014; 9(2): 91-6.
21. Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M, Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by *Nepeta binaloudensis*. *Rev Bras Farmacogn.* 2017; 27(1): 84-90.
22. Tan RX, W Zheng, H Tang. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* 1998; 64(04): 295-302.
23. Jaitak V, Singh B, Kaul V. Variability of volatile constituents in *Artemisia maritima* in western Himalaya. *Nat Prod Res.* 2008; 22(7): 565-568.
24. Mohsen H, Ali F. Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molecules.* 2009; 14(4): 1585-1594.
25. Rashmi T, Francis M, Soumya M. Essential oil composition of *Artemisia japonica* Thunb. from Kerala. *J. Pharmacogn Phytochem.* 2014; 3: 160-163.
26. Emami SA, Vahdati-Mashhadian N, Vosough R, Oghazian MB. The anticancer activity of five species of *Artemisia* on Hep2 and HepG2 cell lines. *Pharmacology online.* 2009; 3: 327-339.
27. Tilaoui M, Mouse HA, Jaafari A, Zyad A. Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells. *PloS one.* 2015; 10(7):e0131799.

28. Deng W, X Jiang, Y Mei, J Sun, et al. Role of ornithine decarboxylase in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008; 40(3): 235-243.
29. Ghasemi Hamidabadi H, Rezvani Z, Nazm Bojnordi M, Shirinzadeh H, et al. Chitosan-intercalated montmorillonite/poly (vinyl alcohol) nanofibers as a platform to guide neuronlike differentiation of human dental pulp stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017; 9(13): 11392-11404.
30. Safipour Afshar A, Saeid Nematpour F, Lakzian M. Effect of *Glycyrrhiza glabra* L. extract on ODC1 gene expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *J Cell Tissue.* 2017; 8(1): 42-51.
31. Safipour Afshar A, Saeid Nematpour F, Shirzad A. Adenosine deaminase (ADA) gene expression changes in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and normal cell line MCF-10A treated by *Glycyrrhiza glabra* extract. *J Cell Mol Res (Iranian J Biology).* 2019.
32. Erguder IB, Namuslu M, Sozener U, Devrim E, et al. Effects of Aqueous Green Tea Extract on Activities of DNA Turn-over Enzymes in Cancerous and Noncancerous Human Gastric and Colon Tissues. *Altern Ther Health Med.* 2008; 14(3): 30-35.

## Effect of *Artemisia herba alba* essential oil on the expression of ADA and ODC1 genes in human breast cancer cells MCF-7

Harati H M.Sc., Saeid Nematpour F\* Ph.D.

. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

\* Email corresponding author: fnematpour@iau-neyshabur.ac.ir

Received: 4 Jan.2021

Accepted: 11 Jul. 2021

---

### Abstract

**Aim:** In this study, the effect of *Artemisia herba alba* essential oil on the survival rate and expression of ODC1 and ADA genes in human breast cancer cell line MCF-7 was studied.

**Material and Methods:** The essential oil (EO) of *A. herba alba* was extracted by Clevenger. Essential oil composition is analyzed by GC-Mass. MCF-7 cell line was treated by increasing concentrations of EO from 0.01 to 0.03 µg/ml. Then cytotoxicity of EO was investigated by MTT assay and the expression of ODC1 and ADA genes were measured by the Real-time PCR method.

**Results:** Most essential oils included Camphor, Chrysanthenyl Acetate, and Davanone. Results showed that by increasing the EO concentration, the cytotoxicity was significantly increased and the calculated IC50 for 24, 48, and 72 h were 0.02104, 0.01858, 0.011751 µg/ml. Moreover, at the concentration of 0.02 µg/ml of EO the expression of the ODC1 and ADA gene decreased by 2 and 1.2-fold against the control, respectively.

**Conclusion:** The cytotoxicity of *A. herba alba* EO, which was observed in this study, seems to be the result of decreased expression of ODC1 and ADA genes in the MCF-7 breast cancer cell line.

**Keywords:** Ornithine decarboxylase, Adenosine deaminase, Viability, Cytotoxicity