

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) بر سلول‌های سرطانی پستان رده سلولی SKBr3

شیوا معلم‌زاده^۱، M.Sc.، الهام رجب بیگی^۲، Ph.D.*، مریم منتظری^۳، Ph.D.

- ۱- گروه بیوشیمی-بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- گروه زیست‌شناسی تکوین، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: rajabbeigi@iautmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲

چکیده

هدف: در این مطالعه اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی درمنه (*Artemisia sieberi*) و تاثیرگذاری آن بر چرخه سلولی در رده سلولی سرطان پستان SKBr3 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه استخراج شد و سلول‌های SKBr3 با غلظت‌های مختلف عصاره (۱، ۰.۱، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۲ و ۸۴ ساعت تیمار شدند. سپس توسط روش MTT و دستگاه فلوسایتومتری، به ترتیب اثر ضدسرطانی و تاثیر عصاره بر چرخه سلولی مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج: براساس داده‌های به‌دست آمده از تست MTT بیش‌ترین سمیت عصاره برای سلول‌ها تعیین شد. میزان IC50 مربوط به عصاره هیدروالکلی در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از طرف دیگر، نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد این عصاره قابلیت توقف چرخه سلولی در گروه‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت را نیز دارد.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه دارای خاصیت ضدسرطانی علیه سلول‌های رده سلولی SKBr3 می‌باشد.

واژگان کلیدی: درمنه، سرطان پستان، چرخه سلولی، عصاره هیدروالکلی

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین دلایل مرگ و میر در جهان است (۲۰۱) که از این میان سرطان پستان در خانم‌ها بسیار رایج می‌باشد و سلامت آن‌ها را به‌خطر می‌اندازد (۳). در سال ۲۰۱۸، ۶۲۷ هزار مرگ ناشی از ابتلا به این بیماری گزارش شده است (۴). سرطان پستان یک بیماری چند عاملی است (۵) و عمده دلایل در ایجاد این بیماری عبارتند از جنسیت (۶)، سن، فاکتورهای تولید مثلی (۷)، فاکتورهای هورمونی (۸)، فاکتورهای ژنتیکی (۹)، سن یائسگی (۱۱، ۱۰)، سقط (۱۲)، تاریخچه خانوادگی (۷)، تراکم بافت پستان (۱۳) و سبک زندگی (۱۵، ۱۴، ۷). میزان شیوع و مرگ‌ومیر حاصل از این بیماری در بخش‌های مختلف جهان به‌دلیل فاکتورهای ژنتیکی و محیطی متنوع و سبک زندگی متفاوت می‌باشد (۱۶). از بزرگ‌ترین محدودیت‌های داروهای ضدسرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروها است (۱۷). مناسب‌ترین روش درمانی توسط پزشک و بیمار و با توجه به مرحله و خصوصیات زیستی سرطان، سن بیمار، خطرات و فواید هر روش درمانی انتخاب می‌شود. برخی از روش‌های درمان سرطان شامل: جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و گیاه درمانی می‌باشند که گیاهان به‌علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۸). از گیاهان دارویی می‌توان به گیاه درمنه یا آرتمیزییا (*A. sieberi*) اشاره کرد که بالغ بر ۴۰۰ گونه از این جنس در جهان و ۳۴ گونه در ایران گزارش شده است. گیاه درمنه متعلق به تیره کاسنیان (*Asteraceae*) می‌باشد. این گیاه بوته‌ای و معطر بوده و رنگ آن سبز متمایل به خاکستری است، بسیار پر شاخه و طعم آن تلخ می‌باشد (۱۹). ترکیبات موثر آن آلفاتیوجون (*alphathujone*)، کامفور (*camphor*)، بتاتیوجون (*betathujone*)، ۱ و ۸ سینئول (*1,8-cineole*) می‌باشد (۲۰). گیاه آرتمیزییا در درمان بیماری‌های مختلف انگلی، باکتریایی، قارچی، التهابی و توموری نقش دارد و قادر به القای آپوپتوزیس و فعالیت ضدتکثیر و آنتی‌اکسیدانتی نیز می‌باشد (۲۱، ۲۲، ۲۳).

گیاه آرتمیزییا قبلاً بر روی سایر رده‌های سلولی سرطان پستان و سایر انواع سرطان‌ها از قبیل کولون، رحم، معده، کبد و خون کار شده است و موثر واقع گردید. تحقیقات نشان داد که عصاره متانولی *A. sieberi* موجب القای مرگ سلولی در رده سلولی MCF7 می‌شود (۲۴). یکی از ترکیبات موثر گیاه آرتمیزییا، سسکوئیتیرپن لاکتونی به‌نام آرتمیزینین می‌باشد که در درمان مالاریا موثر است و از دهه ۱۹۹۰ ویژگی‌های ضدسرطانی آن نیز گزارش شده است (۲۵، ۲۶). این ترکیب در حضور 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 فروپتوزیس را القا می‌کند و متاستاز سرطانی را مهار می‌کند (۲۷). *A. sieberi* گونه‌ای بومی ایران می‌باشد که تحقیقات اندکی روی اثرات ضدسرطانی آن انجام شده است. با توجه به آن که جنس‌های مختلف آرتمیزییا حاوی ترکیبات تا حدودی متفاوت هستند و از طرف دیگر احتمالاً میزان ترکیبات آهن‌دار در بافت‌های سرطانی مختلف نیز متغیر می‌باشد، بنابراین در مطالعه حاضر برای نخستین بار اثرات ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی *A. sieberi* بر رده سلولی سرطان پستان SKBr3 با تمرکز بر سمیت سلولی و ارزیابی چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده سازی عصاره: گیاه *A. sieberi* از منطقه قم جمع‌آوری شد و توسط مرکز هرباریوم دانشگاه تهران شناسایی شد. سپس در مجاورت هوا خشک و آسیاب شد. به‌منظور عصاره‌گیری مقدار ۸۲ گرم از نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۹۶ درصد (زکریا، ایران) قرار گرفت. سپس عصاره صاف شد و به‌مدت یک هفته در دمای اتاق قرار گرفت تا حلال آن تبخیر شد. باقی‌مانده برای انجام آزمایشات در یخچال با درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تهیه رقت‌های مختلف از عصاره گیاه: ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه در ۴ میلی‌لیتر بافر PBS (Merck، آلمان) حل شد و سپس از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون (Get) بایوفیل عبور و مابع کاملاً صاف و استریل شد. رقت‌های بعدی مورد نظر توسط محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) تهیه شد.

کشت سلول: رده سلولی SKBr3 مربوط به سرطان پستان با منشا انسانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت DMEM (Gibco، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco، آمریکا) و ۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی‌سیلین/استرپتومایسین) (Gibco، آمریکا) کشت داده شده و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مکعب در انکوباتور (Memert، آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد نگره‌داری شدند. تمام مراحل فوق در زیر هود لامینار (ژال تجهیز، ایران) و در محیطی کاملاً استریل انجام گرفت.

سنجش سمیت سلولی: MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)

یک نمک تترازولیوم محلول در آب است که براساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده عمل می‌کند (۲۸). پس از پر شدن حدود ۷۰ درصد کف فلاسک، با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر PBS (Phosphate Buffer Serum) (Merck، آلمان) شستشو شده و تخلیه شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر تریپسین (Gibco، آمریکا) اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و به منظور کند شدن عملکرد آنزیم تریپسین ۲۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به داخل لوله آزمایش در پیچ‌دار منتقل شدند. بعد از شمارش سلول‌های موجود در فالكون، به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه (SPL، کره) 8×10^3 سلول منتقل شد و با دوزهای مختلف عصاره تیمار شد. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ابتدا سلول‌ها با استفاده از بافر PBS شست و شو داده شدند. سپس محلول MTT (Merck، آلمان) (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از طی زمان انکوباسیون، محلول رویی در چاهک‌ها خالی شد و ۰۰۱ میکرولیتر محلول OSMD (kcreM، آلمان) به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۶۹ خانه‌ای اضافه شد و سپس توسط الیزا ریدر (cetoIB، آمریکا) جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۰۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و سپس داده‌ها در نرم افزار msirP daP hparG وارد شدند و میزان 05CI مربوط به هر زمان محاسبه شد.

ساخت غلظت IC50 (۲۴ و ۴۸ ساعت) از محلول آماده شده اولیه: طبق داده‌های آنالیزی نرم افزار Graph Pad

Prism، IC50 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. طبق اعداد به دست آمده غلظتی از عصاره که دارای میزان جذب به اندازه نصف جذب مشاهده شده در کنترل منفی می‌باشد را به عنوان IC50 در نظر گرفته می‌شود و بیان‌گر غلظتی از عصاره می‌باشد که باعث مرگ سلولی در ۰۵ درصد از جمعیت سلولی تیمار شده، می‌شود. با توجه به رابطه‌ی $2V \times 2M = 1V \times 1M$ حجم مناسب از محیط کشت MEMD و محلول آماده شده اولیه برای افزودن به چاهک‌های پلیت‌های ۶ خانه ۴۲ و ۸۴ ساعت برای تست چرخه سلولی برآورده شد.

سنجش چرخه سلولی: در ابتدا محیط کشت درون فلاسک حاوی رده سلولی SKBr3 توسط ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر PBS

شست و شو شد و تخلیه شد. به منظور کنده شدن سلول‌ها از کف فلاسک ۱۰۰۰ میکرولیتر تریپسین به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد محتوی فلاسک به یک لوله آزمایش در پیچ‌دار منتقل و به آن در حدود ۲۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM افزوده شد. بعد از شمارش سلول‌ها، حجم سلولی مورد نظر ۳ میلی‌لیتر محاسبه شد و به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای (SPL، کره)، 1×10^5 سلول منتقل شد. از لوله آزمایش در پیچ‌دار (حاوی ۳ میلی‌لیتر سلول و ۱۷ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM) به هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای، ۱۰۰۰ میکرولیتر اضافه شد و انکوبه شد. بعد از پایان مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با توجه به IC50 هر زمان، لوله آزمایش در پیچ‌دار مخصوص به آن‌ها تهیه شد و سپس محیط رویی چاهک‌ها، تخلیه شد و از آن لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ۲ میلی‌لیتر به چاهک‌های مرتبط افزوده و انکوبه شد. در ادامه، هر چاهک از پلیت به لوله آزمایش در پیچ‌دار همانام با خود منتقل شد و هر چاهک با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر PBS مورد شست

و شو قرار گرفت، سپس ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین به آن اضافه و به لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار منتقل شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (ژال تجهیز، ایران) شدند و به رسوب آن‌ها، ۹۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد (زکریا، ایران) و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS اضافه شد. در آخر برای خوانش آن توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur BD، انگلیس) به هرکدام از لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار کوکتل نهایی (۲۰ میکرولیتر PI (Sigma، آمریکا) و ۲۰ میکرولیتر RNase A (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر تراپتون X ۱۰۰ (Sigma، آمریکا) که همگی در بافر PBS حل شده و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسیده) اضافه شد.

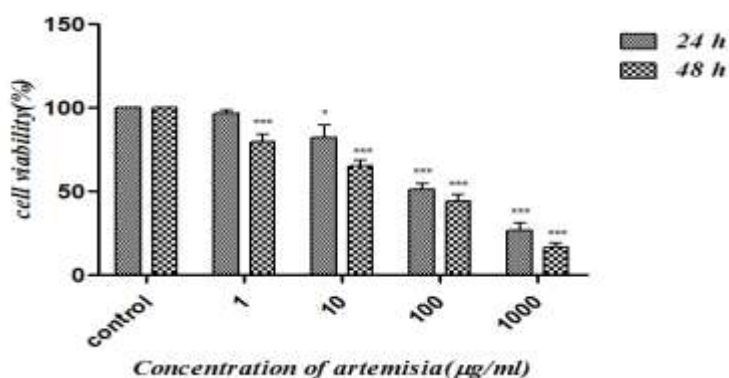
آنالیز آماری

نتایج به دست 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 5 (Graph pad 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 دو طرفه (Two-way ANOVA) برای مقایسه گروه‌ها با کنترل استفاده شد. همچنین ($p < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

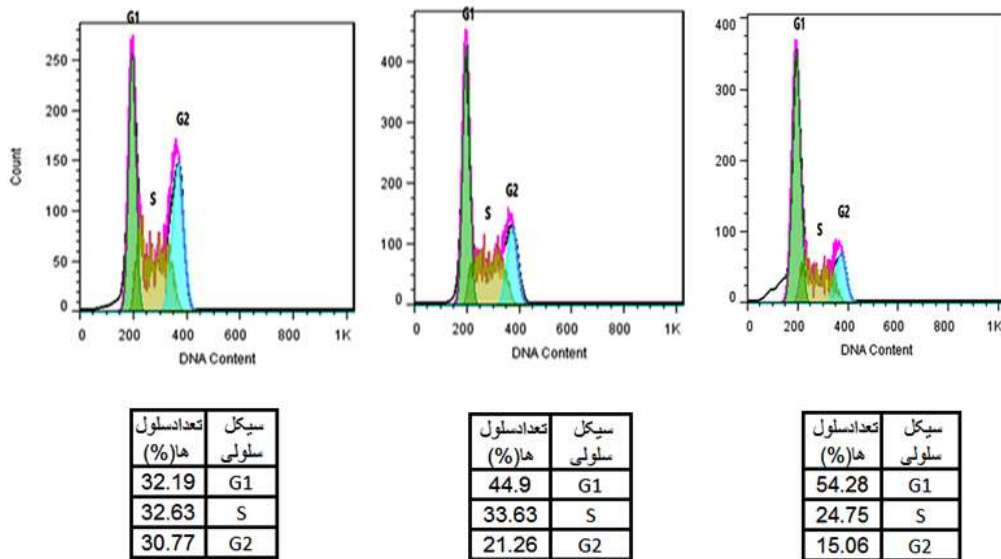
بررسی سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه بر روی رده سلولی SKBr3 با استفاده از تست MTT انجام شد. همان‌طور که نتایج تحلیل آماری در شکل ۱ نشان داده است. عصاره مورد نظر در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت در سطح $p < 0.05$ و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت در سطح معنی‌داری $p < 0.001$ و در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت در سطح $p < 0.001$ موجب کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل شد. این نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلولی عصاره وابسته به دوز و زمان است.

همچنین مقادیر IC_{50} عصاره پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج حاصل از تاثیرگذاری این عصاره بر فازهای مختلف چرخه سلولی سلول‌های 3rBKS توسط دستگاه فلوسایتومتری در زمان‌های ۴۲ و ۸۴ ساعت در شکل ۲ آورده شده و در شکل ۳ آنالیز شده است.

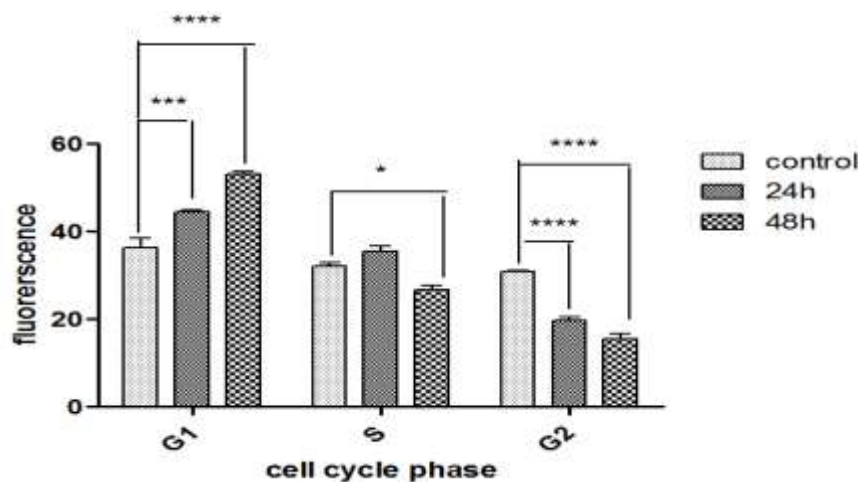


شکل ۱: میزان درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه آرتیمیزیا سبیری. نمودار نشان می‌دهد که درصد

بازدارندگی این عصاره روی سلول‌های سرطان پستان SKBr3 وابسته به دوز و زمان می‌باشد. مقایسه سلول‌ها با هم با آزمون آماری $p < 0.001$ *** و $p < 0.05$.*



شکل ۲: نتیجه مبتنی بر میزان فلوروسنت و درصد سلول‌ها در چرخه سلولی در سه گروه کنترل، ۲۴ و ۴۸ ساعت (به ترتیب از چپ به راست)



شکل ۳: مقایسه شدت تغییرات سه فاز چرخه سلولی در دو گروه تیمار و یک گروه کنترل تحت تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه آرتیمیزیان سبیری ($P < 0.05$), $P < 0.001$ ***, $P < 0.0001$ ****, $P > 0.05$ (ns).

بحث

سرطان مشکلی روبه‌رشد در سراسر جهان می‌باشد و یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در جوامع انسانی است (۲۹). بیشتر گیاهانی که در طبیعت وجود دارند دارای خاصیت دارویی هستند. عوامل دارویی در گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌توانند به‌عنوان یک عامل ضدسرطانی عمل کنند (۳۰). امروزه فرآورده‌های گیاهی نسبت به سایر روش‌های درمانی نظیر شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون‌درمانی به‌علت در دسترس و ارزان بودن و داشتن عوارض جانبی کمتر بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۱).

در مطالعه حاضر اثرات ضدسرطانی گیاه *A. Sieberi* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری بر روی سمیت سلولی رده سلولی SKBr3 دارد. بیش‌ترین اثر مهاری این عصاره در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت بوده است. از طرف دیگر

حداکثر تاثیر آن بر چرخه سلولی بر تمامی فازها (G1 و S و G2) در ۴۸ ساعت بوده است. مطالعات گذشته نشان داده است که عصاره گیاه *A. capillaris Thunberg* در غلظت ۲۰۰-۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع تکثیر سلول‌های هیپاتومای انسانی SMMC-7721 در طی ۷۲ ساعت و القای توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می‌شود (۳۲). نتایج تحقیق دیگری نشان داد که عصاره متانولی گیاه *A. absinthium* در غلظت ۲۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب باعث مهار رشد ۵۰ درصدی سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 شده و اوج القای آپوپتوزیس این گیاه در فاز قبل از G1 در مدت زمان ۷۲ ساعت بوده است (۳۳). کیم و همکارانش نشان دادند که عصاره برگ گیاه *A. princeps* قابلیت مهار رده‌های سلولی آندومتريوتیک انسانی (11Z و 12Z) در فاز G1 چرخه سلولی دارد. علاوه بر این، عصاره گیاه موجب فعال‌سازی کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ شده است (۳۴). در تحقیق حاضر نیز عصاره هیدروالکلی *A. sieberi* منجر به القای آپوپتوزیس و توقف چرخه سلولی شده است.

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 (۳۵). گزارش شده است که اثر مهاری عصاره اتیل استاتی گیاه *A. capillaris Thunberg* بر سلول‌های سرطانی هیپاتوسلولار (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 (۳۶). میرکین و همکاران (۳۷) نشان دادند که گیاه *A. absinthium* می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک مزمن القا کند. عصاره متانولی گیاه *A. annua* با غلظت‌های مختلف سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌های Reh و Nalm-6 می‌شود (۳۸). نشان 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 به مدت ۷۲ ساعت شده است (۳۹). 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 (۴۰، ۴۱). تحقیقات گردانیان و همکاران (۲۴) نشان داد که عصاره متانولی *A. sieberi* موجب القای مرگ سلولی در رده سلولی MCF7 می‌شود. همچنین نشان داده شده است که مهم‌ترین مواد موثره گیاه آرتیمیزیا لیمون، اوژنول، آلفا پینن، توژون، بورنئول، پیپریتون، کامفور و مقادیر زیادی آرتیمیزین است. همچنین این ترکیبات موجب القای آپوپتوزیس، مهار رشد سلول‌های توموری و توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M می‌شوند (۴۲). آرتیمیزینین در حضور 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 (۲۷). نتایج این تحقیق از آن جهت با مطالعه ما همسو است که در مدت زمان ۴۸ ساعت بیش‌ترین اثر ضدتکثیری بر روی سلول‌های سرطانی مشاهده شده است. نتایج این تحقیقات خاصیت القای آپوپتوزی حاصل از مطالعه حاضر بر روی رده سلولی SKBr3 را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص گردید بیش‌ترین اثر مهاری عصاره هیدروالکلی گیاه *A. sieberi* در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی SKBr3 بوده است. از طرفی عصاره مذکور بر سلول‌های سرطانی فوق در فازهای (G1 و G2) و (G1 و S و G2) از چرخه سلولی به ترتیب در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت اثر داشته است. با توجه به نتایج

به دست آمده، عصاره هیدروالکلی گیاه درمنه به عنوان یک داروی موثر در درمان انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. البته شناخت مکانیسم‌های موثر اثر عصاره در القای اثرات آپوپتوتیک بر روی این رده سلولی نیازمند تحقیقات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران می‌باشد.

منابع

1. Momeni movahed Z, Salehinita H. Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomed Res Ther.* 2017; 4(12): 1795-1811.
2. Momeni movahed Z, Ghoncheh M, Pakzad R, Hasanpour H, et al. Incidence and mortality of uterine cancer and relationship with Human Development Index in the world. *Cukurova Med J.* 2017; 42(2): 233-240.
3. Ferley J, Soerjomatarami I, Ervik M, Dikshit R, et al. Cancer Incidence and Mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5): E359-86.
4. B. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
5. Zendejdel M, Niakan B, Keshtkar A, Rafiei E, et al. Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol. *Iran J Med Sci.* 2018; 43(1): 1-8.
6. Giordano SH, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Breast Cancer in Men. *Ann Intern Med.* 2002; 137(8): 678-687.
7. Thakur P, Seam RK, Gupta M, Sharma M, et al. Breast cancer risk factor evaluation in a Western World. *South Asian J Cancer.* 2017; 6(3): 106-109.
8. Bhadoria A, Kapil U, Sareen N, Singh P. Reproductive factors and breast cancer: A case-control study in tertiary care hospital of North India. *Indian J Cancer.* 2013; 50(4): 316-321.
9. Cobain EF, Milliron KJ, Merajver SD. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. *Semin Oncol.* 2016; 43(5): 528- 535.
10. Kim Y, Yoo K-Y, Goodman MT. Differences in Incidence, Mortality and Survival of Breast Cancer by Regions and Countries in Asia and Contributing Factors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(7): 2857-2870.
11. Laamiri FZ, Bouayad A, Hasswane N, Ahid S, et al. Risk Factors for Breast Cancer of Different Age Groups: Moroccan Data? *Open J Obstet Gynecol.* 2015; 05(02): 79-87.
12. Wu MH, Chou YC, Yu JC, et al. Hormonal and body-size factors in relation to breast cancer risk: a prospective study of 11,889 women in a low-incidence area. *Ann Epidemiol.* 2006; 16(3): 223-229.

13. Bravi F, Decarli A, Russo AG. Risk factors for breast cancer in a cohort of mammographic screening program: a nested case-control study within the FRiCaM study. *Cancer Med.* 2018; 7(5): 2145-2152.
14. Miller ER, Wilson C, Chapman J, Flight I, et al. Connecting the dots between breast cancer, obesity and alcohol consumption in middle-aged women: ecological and case control studies. *BMC Public Health.* 2018; 18(1): 460.
15. Andersen ZJ, Stafoggia M, Weinmayr G, Pedersen M, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of postmenopausal breast cancer in 15 European cohorts within the ESCAPE project. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(10):107005.
16. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, et al; ABREAST Investigators. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer.* 2005; 6(5): 391-401.
17. Katzung B, Masters S, Terevor A. *Basic and clinical pharmacology.* 11th Ed. Newyork: McGrawHill Medical; 2009.
18. Karen LM, Mark Al, Peter Sh. Treatment of breast cancer. *Am Fam Phisician.* 2010; 81(11): 1339-1346.
19. Mahboubi M. *Artemisia sieberi* in Traditional and Modern Medicine. *J Biol Active Prod Nat.* 2014; 4(2): 149-157.
20. Youssefi MR, Abouhosseini Tabari M, Moghadamnia AA. In vitro and in vivo activity of *Artemisia sieberi* against *Trichomonas gallinae*. *Iran J Vet Res.* 2016; 18(1): 25-29.
21. Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J Biomed Biotechnol.* 2012; (247597): 1-18.
22. Efferth T, Schwabe Award W. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside. *Planta Med.* 2007; 73(4): 299-309.
23. Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules.* 2010; 15(5): 3135-70.
24. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. Evaluation of Cytotoxicity of Sagebrush Plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. *Armaghane Danesh;* 2013. 18(3):241-51.
25. Bhaw-Luximon A, Jhurry D, Artemisinin and its derivatives in cancer therapy: status of progress, mechanism of action, and future perspectives, *Cancer Chemoth Pharm.* 2017;79(3): 451-466.
26. Isani G, Bertocchi M, Andreani G, Farruggia G, et al. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the DCanine Osteosarcoma Cell Line. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 1615758.
27. Efferth T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2017; 46: 65-83.

28. Iselt MA, Hoitel WJ, Hilgad PT. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Drug Res.* 1998; 39: 125-9.
30. Smith-Warner SA, Elmer PJ, Tharp TM, Fosdick L, et al. Increasing vegetable and fruit intake: randomized intervention and monitoring in an at risk population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(3): 307-17.
31. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(5): 683-690.
32. Karen LM, Mark A, Peter Sh. Treatment of breast cancer. *Am Fam Phisician.* 2010; 81(11): 1339-1346.
33. Qiao Hu Y, Xiang Tan R, Yian Chu M, Zhou J. Apotosis in Human Hepatoma Cell Line SMMC-7721 Induced by Water-soluble Macromolecular Components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91(1): 113-117.
34. Shafi G, N.Hasan T, Ahmed Syed N, A.Al-Hazzani A, et al. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(7): 7373-7379.
35. Kim J, Jung S, Yang Y, Ahn J, et al. *Artemisia* leaf extract induces apoptosis in human endometriotic cells through regulation of the p38 and NF kB pathways. *J Ethno pharmacol.* 2013; 145(3): 767-775.
36. 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 Res.* 2007; 27(68): 3891-3898.
37. Mirkin V, Berrebi A, Rakhman I, Haran M, et al. 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.
38. Honghua Yan, Kyung Hee Jung, Juyoung Kim, Marufa Rumman, et al. *Artemisiacapillaris* extract AC68 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma by blocking the PI3K/AKT pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018; 98: 134-141.
39. Mashati P, Esmaeili S, Dehghan Nayeri N, Darvishi M, et al. The effect of methanolic extract of aerial parts of *Artemisiaannua* on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh. *Sci J Iran Blood Transfus Organ.* 2017; 14(1): 34-42.
40. Emami A, Zamani Taghizadeh Rabe Sh, Ahi A, Mahmoudi M. Cytotoxic Effects of *Artemisiaannua* Methanol Extract on Cancer Cell Lines in Vitro. *J Kerman Univ Med Sci,* 2010; 17(3): 215-225.
41. Tayarani-Najaran Z, Sareban M, Gholami A, Emami SA, et al. Cytotoxic and Apoptosis effects of different extracts of *Artemisia turanica Krasch.* On K562 and HL-60 cell lines. *Sci World J.* 2013; 2013: 1-6.
42. Tayarani-Najaran Z, Sadat Makki F, Sadat Alamolhodaei N, Mojarrab M, et al. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisiabiennis* Willd. On K562 and HL-60 cell lines. *Iran J Basic Med Sc.* 2017; 20(2): 166-171.

Investigation on cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* on SKBr3 cell line

Moalemzadeh Sh, M.Sc.¹, Rajabbeigi E, Ph.D.^{2*}, Montazeri M, Ph.D.³

1. Department of Biochemistry-Biophysics, Faculty of Advance Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Developmental Biology, Faculty of Advance Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advance Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: rajabbeigi@iautmu.ac.ir

Received: 22 Jan. 2020

Accepted: 29 Feb. 2020

Abstract

Aim: This study was performed to evaluate the cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* and its effect on the cell cycle in the SKBr3 breast cancer cell line.

Material and Methods: In this study, hydroalcoholic extract of *Artemisia* was prepared. SKBr3 cells were exposed to different concentrations (1, 10, 100, 1000 μgml^{-1}) of extract at two different time intervals of 24 and 48 h. We employed MTT assay and flow cytometry analysis to evaluate effects of the prepared extract on the cell cycle characteristics and its cytotoxic properties.

Results: Based on the data obtained from the MTT test, the highest toxicity of the extract observed at the concentration of 1000 μgml^{-1} within 48 h after the extract exposure. The IC₅₀ of hydroalcoholic extract was 150 and 50 μgml^{-1} at 24 and 48 h, respectively. According to the data obtained from flow cytometry analysis, the extract arrests cell cycle in 24 and 48 h treatment groups.

Conclusion: The hydroalcoholic extract of *Artemisia* at certain concentrations inhibits the growth of SKBr3 breast cancer cells by ceasing cell cycle step.

Keywords: *Artemisia*, Breast cancer, Cell cycle, Hydroalcoholic extract