



Investigation the expression changes of miR-34a, BAX, Caspase 9, Caspase 3 in pancreatic cancer cells (AsPC-1 cell line) treated with methanolic extract of *Artemisia absinthium* and 5-Fluorouracil

Madani MS^a, Nejad Shahrokhbadi Kh^{a*}, baharara j^b, Lotfi M^a

^a Department of Biology, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

^b Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Ma.c, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Lotfi M, Nejad Shahrokhbadi Kh, baharara j, Madani MS. Investigation the expression changes of miR-34a, BAX, Caspase 9, Caspase 3 in pancreatic cancer cells (AsPC-1 cell line) treated with methanolic extract of *Artemisia absinthium* and 5-Fluorouracil. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(1):89-103.

<https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.89>

KEY WORDS

Pancreatic cancer, *Artemisia absinthium*, 5-fluorouracil, microRNA, apoptosis

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer-related deaths worldwide. 5-Fluorouracil is one of the commonly used chemotherapeutic drugs. The plant *Artemisia absinthium* has attracted attention as a potential herbal anticancer agent. This study investigated the effect of the methanolic extract of this plant on the expression of miR-34a and the apoptotic genes BAX, Caspase-3, and Caspase-9 in AsPC-1 pancreatic cancer cells.

Aims: This study aimed to evaluate the cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Artemisia absinthium* methanolic extract on pancreatic cancer cells. The research specifically investigated the molecular mechanism by analyzing expression changes in the tumor suppressor miR-34a and key apoptotic genes BAX, Caspase-3, and Caspase-9 to elucidate the extract's anti-cancer mode of action.

Materials and Methods: To evaluate the cytotoxic effects of the plant extract on cancer cells, an MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)) assay was performed to determine the viability and survival rate of the cells following treatment with various concentrations of the extract, the chemotherapeutic drug fluorouracil (5-FU), and the combined treatment of the extract and the drug. This assay measures cellular metabolic activity and allows quantification of live and dead cells after exposure to different treatments. Based on the obtained results, the IC₅₀

* Corresponding author. Tel.: 09363175405

E-mail address: maryam.lotfi74@yahoo.com

<https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.89>

Received: 5 Nov. 2025; Received in revised form: 24 Feb. 2026; Accepted: 5 Mar. 2026

Original Article

© Author



value for each treatment was calculated, representing the concentration at which 50% of the cells were inhibited or killed. After determining the IC_{50} value, cells were treated with concentrations equal to, lower than, and higher than the IC_{50} to further investigate the cytotoxic effects and the mode of cell death induced by the treatments. To distinguish between apoptotic and necrotic cell death, the Annexin V-FITC/PI assay was employed. This assay detects phosphatidylserine externalization on the cell membrane and enables differentiation between live, early apoptotic, late apoptotic, and necrotic cells.

In addition to the morphological and physiological assessments, molecular analyses were conducted to examine the expression levels of key apoptosis-related genes, including Caspase-3, Caspase-9, and BAX, as well as the regulatory microRNA miR-34a. Gene expression analysis was performed using Real-time PCR (qPCR).

Results: The results of the MTT assay demonstrated that the proliferation of AsPC-1 pancreatic cancer cells was inhibited by treatment with the extract of *Artemisia absinthium* and the chemotherapeutic drug fluorouracil (5-FU) in a concentration-dependent manner. As the concentration of each treatment increased, cell viability significantly decreased, indicating a marked cytotoxic effect of both the plant extract and the drug. Moreover, a possible synergistic effect between the extract and fluorouracil in suppressing cell proliferation was observed. To determine the mode of cell death induced by these treatments, the Annexin V-FITC/PI assay was performed. The results revealed that a considerable proportion of treated cells underwent programmed cell death (apoptosis), while the percentage of necrotic cells remained relatively low. These findings suggest that the observed reduction in cell viability is mainly mediated through the activation of apoptotic pathways rather than necrosis. Furthermore, real-time PCR analysis showed a significant upregulation in the expression of the regulatory microRNA miR-34a and the apoptosis-related genes Caspase-3, Caspase-9, and BAX in the treated groups compared to the control group.

Discussion: The obtained results suggest that *Artemisia absinthium* extract exerts its cytotoxic effect primarily through the induction of apoptosis rather than necrosis in AsPC-1 pancreatic cancer cells. The observed upregulation of miR-34a, Caspase-3, Caspase-9, and BAX implies activation of intrinsic apoptotic pathways. These findings are consistent with previous studies reporting pro-apoptotic properties of *A. absinthium* and other *Artemisia* species. Therefore, the extract may enhance the therapeutic response of pancreatic cancer cells when combined with conventional chemotherapeutic agents such as fluorouracil (5-FU).

Conclusion: In conclusion, *Artemisia absinthium* extract demonstrated strong antiproliferative and apoptosis-inducing effects on AsPC-1 cancer cells in a dose-dependent manner. Its combination with fluorouracil (5-FU) produced a synergistic cytotoxic effect, significantly enhancing cell death through apoptotic signaling. The molecular findings support the potential of this extract as a complementary therapeutic agent. Further studies are recommended to explore its mechanisms and evaluate its efficacy in *in vivo* models of pancreatic cancer.



بررسی تغییرات بیان Caspase 3 و Caspase 9, BAX, miR-34a در سلول‌های سرطانی پانکراس (رده-1 ASPC) تیمار شده با عصاره تام متانولی *Artemisia absinthium* و ۵-فلورواوراسیل

محدثه سادات مدنی^۱، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۱، جواد بهار آرا^۲، مریم لطفی^۱

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
سرطان پانکراس، آرتمیسیا ابسنتینوم، ۵-فلورواوراسیل، میکرو RNA آپوتوزیس	<p>هدف: هدف از این پژوهش تاثیر عصاره متانولی این گیاه را بر بیان miR-34a و ژن‌های BAX, Caspase3, Caspase9 در سلول‌های سرطانی پانکراس ASPC-1 بود. مواد و روش‌ها: میزان بقای سلول‌های سرطانی تحت تاثیر عصاره گیاه، داروی فلورواوراسیل و هم افزایی عصاره و دارو با آزمون MTT اندازه‌گیری و مقدار IC50 به دست آمد. سپس با توجه به مقدار IC50 و غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از آن و برای تعیین نوع مرگ سلولی در گروه‌های تیمار شده و شاهد از آزمون Annexin V-FITC استفاده شد. برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر، miR-34a و ژن‌های آپوتوزیسی Caspase3, Caspase9 و BAX، از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. نتایج: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که تکثیر سلول‌های سرطانی ASPC-1 تحت تیمار با عصاره <i>Artemisia absinthium</i> و فلورواوراسیل به صورت وابسته به غلظت مهار می‌شود و بر اساس نتایج تست Annexin V-FITC نوع مرگ سلولی در گروه‌های تیماری، آپوتوزیس است و نتایج حاصل از تست Real-time PCR نشان دهنده افزایش بیان ژن miR-34a و ژن‌های آپوتوزیسی Caspase-3, Caspase-9, BAX در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد است. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه تجربی نشان داد که عصاره تام متانولی <i>Artemisia absinthium</i> و فلورواوراسیل به صورت هم افزایی تکثیر سلول‌های سرطانی ASPC-1 را مهار می‌کند و باعث القای آپوتوزیس در این سلول‌ها می‌شود.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۴	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۴	

۱- مقدمه

سرطان یک بیماری پیچیده است که با تکثیر سلولی غیرطبیعی، غیرقابل کنترل و با پتانسیل متاستاز به سایر قسمت‌های بدن از طریق گردش خون و یا گردش خون لنفاوی شناخته می‌شود (۱ و ۲). سرطان یکی از جدی‌ترین بیماری‌های قرن بیست و یکم می‌باشد، به طوری که احتمالاً از هر چهار نفر، یک نفر در طول زندگی خود در معرض خطر ابتلا به سرطان قرار دارد. بر اساس برآوردهای به روز شده از آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) در سال ۲۰۲۲ نزدیک به ۲۰

میلیون مورد جدید سرطان و ۹/۷ میلیون مرگ ناشی از سرطان گزارش شده است. این ارقام نشان می‌دهد که سرطان همچنان یک بار عمده و رو به رشد برای سلامت عمومی در جهان محسوب می‌شود (۳ و ۴). با وجود پیشرفت‌های روز افزون هنوز درمان قطعی برای بیماری سرطان پیدا نشده است، جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی یا ترکیبی از این روش‌ها برای کوچک کردن و از بین بردن تومور استفاده می‌شود. هورمون درمانی، پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان و ایمنی درمانی از جمله سایر روش‌های درمانی برای مبارزه با بیماری سرطان می‌باشند (۵). با این وجود در بسیاری از موارد سلول‌های سرطانی در نهایت می‌توانند با راهکارهای درمانی ارائه شده مقابله کرده و حتی گاهی با بروز مقاومت به شیمی درمانی از درمان‌های به کار رفته، برای رشد سریع‌تر تومور بهره ببرند (۶). سرطان پانکراس یکی از تهاجمی‌ترین و کشنده‌ترین سرطان‌ها می‌باشد، در سال ۲۰۲۰؛ ۴۱۸۰۰۰ مورد جدید ابتلا به سرطان پانکراس شناسایی شده است؛ میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پانکراس تقریباً با میزان بروز آن برابر می‌باشد (۷ و ۸). این نوع از سرطان به علت علائم ناخوشایند مانند متاستاز پیش از موعد (حدود ۸۰ درصد از بیماران در زمان تشخیص به مرحله غیر قابل توقف بیماری رسیده‌اند و بیماران دچار متاستاز شده‌اند و مقاومت نسبت به شیمی درمانی به‌عنوان چهارمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان به‌شمار می‌رود؛ تنها روش‌های درمان سرطان پانکراس جراحی همراه با شیمی درمانی است. تقریباً شش درصد از بیماران مبتلا به سرطان پانکراس دارای نرخ بقای ۵ سال می‌باشند، اما در کل متوسط میزان بقا در میان مبتلایان به این سرطان در حدود ۶ ماه است. عدم موفقیت در درمان سرطان پانکراس عمدتاً به دلیل تشخیص ضعیف در مراحل اولیه بیماری، پیشرفت سریع و نتایج نا امید کننده درمان جراحی، مربوط می‌شود. آدنوکارسینوما می‌جرای پانکراس شکل غالب سرطان پانکراس است و بیشتر از ۸۵ درصد موارد بالینی را به‌خود اختصاص می‌دهد. بعضی از عوامل خطر ساز ایجاد سرطان پانکراس عبارتند از: اختلالات ژنتیکی، سابقه خانوادگی، رژیم‌های غذایی با چربی زیاد و غیره (۹-۱۱). بعضی از نشانه‌های سرطان پانکراس می‌تواند شامل کاهش وزن شدید، درد شکم، ایجاد تومور در نزدیکی مجرای صفاوی که می‌تواند باعث زردی پوست و چشم شود و همچنین حالت تهوع و استفراغ باشد (۱۲). فلوروپیریمیدین‌ها مانند ۵-فلوروووراسیل پایه و اساس طیف گسترده‌ای از رژیم‌های شیمی درمانی را تشکیل می‌دهند. ۵-فلوروووراسیل سومین ماده شیمی درمانی رایج در درمان انواع سرطان‌ها در سراسر جهان است. این دارو به‌طور اختصاصی به‌صورت آنتاگونیست متابولیسم پیریمیدین‌ها عمل می‌کند و به‌عنوان یک آنتی متابولیت طبقه‌بندی می‌شود و با مهار سنتز پیریمیدین‌ها باعث می‌شود که ساخت DNA مهار می‌شود و نهایتاً منجر به مرگ سلولی یا آپوپتوزیس می‌شود (۱۳). فرآیند آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به‌عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن‌ها می‌باشد که به منظور حذف سلول‌های ناخواسته یا غیر ضروری در موجودات زنده به کار می‌رود. این فرآیند در تنظیم میزان رشد و تکثیر سلول‌ها بسیار مهم بوده و بروز بسیاری از بیماری‌ها، مانند انواع سرطان‌ها، نتیجه عملکرد ضعیف یا مهار شدن پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. آپوپتوزیس می‌تواند از طریق دو مکانیسم سیگنالینگ اصلی رخ دهد: مسیر بیرونی که به عنوان مسیر گیرنده مرگ نیز شناخته می‌شود و مسیر درونی یا میتوکندریایی. در میان پروتئین‌های تنظیمی دخیل، خانواده Bcl-2 نقش محوری دارند، به‌ویژه Bax (پیش‌برنده آپوپتوزیس) و Bcl-2 (ضد آپوپتوزیس)، که بر فعال‌سازی کاسپازها تاثیر می‌گذارند. نشانگرهای کلیدی آپوپتوزیس مانند Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ به مسیر PI3K/AKT مرتبط هستند (۱۴ و ۱۵). کاسپازها نوعی از پروتئازهای سیستمین-آسپاراتات مربوط به مسیر آپوپتوزیس می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم و اجرای آپوپتوزیس ایفا می‌کنند. کاسپاز-۳ می‌تواند به‌عنوان یک آنزیم پیرایش انتهایی در آپوپتوزیس عمل کند و در مکانیسمی که داروهای سیتوتوکسیک سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند، شرکت کند (۱۶). از زمان‌های بسیار قدیم، محصولات طبیعی جدا شده از گیاهان دارویی برای

درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گرفت، این امر به این دلیل است که گیاهان کارخانه‌های شیمیایی پیچیده‌ای هستند که به‌طور مداوم در حال تولید محصولات طبیعی هستند و می‌توانند منبع موثری برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها باشند، همچنین مشخص شده است که گیاهان دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی و بیولوژیکی هستند. در طول تاریخ، درمان‌های گیاهی همواره نقش محوری در مبارزه با سرطان ایفا کرده‌اند و در گذر زمان تکامل یافته‌اند (۱۷-۱۹). یکی از پرکاربردترین گیاهان به‌عنوان گیاهان دارویی، جنس *Artemisia* (درمنه) متعلق به خانواده *Asteraceae* می‌باشد که از حدود ۵۰۰ گونه در سراسر جهان تشکیل شده است. در ایران ۳۴ گونه شناخته شده از *Artemisia* وجود دارد (۲۰ و ۲۱). جنس *Artemisia* شامل گیاهان دارویی مهمی می‌باشد که به‌دلیل ترکیبات شیمیایی و فیتوشیمیایی ویژه خود در سراسر جهان مورد توجه بوده است. به‌دلیل اجزا و ترکیبات منحصر به فرد از جمله آرتمیزین، ترکیبات آروماتیک، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و یا مشتقات فنل که به فعالیت‌های بیولوژیکی آن، به ویژه فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و اثرات آن در برابر سرطان کمک می‌کند، در طب سنتی، صنعت داروسازی و صنایع آرایشی-بهداشتی مورد استفاده می‌باشد (۲۰-۲۲). با توجه به این ویژگی‌های امیدوارکننده، *Artemisia* و ترکیبات فعال حاصل از آن به‌عنوان داروهای ضد سرطانی، ضد مالاریا، آنتی‌اکسیدانتی، سیتوتوکسیک، ضد اسپاسم، ضد التهابی، ضد میکروبی و غیره بررسی شده‌اند (۲۲). بعضی از تحقیقات نشان داده‌اند که عصاره برخی از گونه‌های *Artemisia* دارای فعالیت سیتوتوکسیکی و اثر آپوپتوزیسی در شرایط آزمایشگاهی در برابر رده‌های سلولی سرطانی و مدل‌های حیوانی سرطانی می‌باشد و در مقابل دارای سمیت کم در برابر سلول‌های طبیعی است. وجود ترکیباتی چون آرتمیزین در برخی از گونه‌های این گیاه باعث می‌شود که این گیاه دارای فعالیت ضد رگزایی و ضد سرطانی و همچنین دارای اثر آپوپتوزیسی باشد (۲۳)

MicroRNAها، مولکول‌های RNA کوچک ۱۹ تا ۲۲ نوکلئوتیدی به‌شدت محافظت شده و غیر کدکننده‌ای هستند که در تنظیم فرآیندهای سلولی گسترده و متنوع از طریق تداخل با بیان پروتئین یا تخریب mRNA دخالت دارند. MicroRNAها نقش مهمی در عملکردهای بیولوژیک از جمله تکثیر سلولی، تمایز، تعیین سرنوشت سلول، انتقال سیگنال، تکامل، تومورزایی و پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند MicroRNAها در روند سرطان می‌توانند به‌عنوان سرکوبگر تومور یا انکوژن عمل کنند و حتی گاهی بسته به نوع تومور هر دو نقش را دارند (۲۴). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که بیان miR-34a در سرطان پانکراس کاهش پیدا می‌کند و کاهش بیان miR-34a مانع از ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پانکراس می‌شود (۲۵). هدف از انجام این پژوهش بررسی تغییرات بیان miR-34a و ژن‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و BAX در سلول‌های سرطانی پانکراس تیمار شده با عصاره تام متانولی گیاه آرتمیزیا و داروی ۵-فلوراوراسیل است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش کلیه مراحل آزمایش بر اساس اخلاق کمیته اخلاق پژوهشی نهادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. (مجوز شماره IR.IAU.MSHD.REC.1402.086).

تهیه و کشت سلول‌های رده *AsPC-1*: رده سلولی *AsPC-1* (سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی) از انسیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین-پنی‌سیلین و درون فلاسک‌های کشت سلولی، کشت داده شد.

تهیه محلول تیماری عصاره تام متانولی *Artemisia absinthium*: برای تهیه عصاره متانولی گیاه *Artemisia absinthium* ابتدا اندام‌های هوایی گیاه خشک شده و سپس پودر شدند، سپس به‌ازای هر یک گرم از پودر گیاه؛ مقدار ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و به‌مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد. در طی این مدت مخلوط روزی ۳ بار جهت هم خوردن و مخلوط شدن مواد به‌خوبی تکان داده شد. پس از طی زمان ۷۲ ساعت، مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ واتمن صاف و در نهایت عصاره گیری توسط دستگاه "Rotary Evaporator" انجام شد؛ سپس عصاره حاصل، در دمای بین ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دستگاه آون به‌منظور تبخیر متانول قرار داده شد تا پودر خشک عصاره به‌دست آمد. برای تهیه استوک اصلی؛ ۰/۰۰۱ گرم از پودر عصاره وزن شد و در ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید حل شد، سپس با محیط کشت به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل برای استفاده‌های بعدی در شرایط تاریکی نگه داری شد. جهت ساخت غلظت‌های تیماری از استوک اصلی از فرمول $N1V1=N2V2$ استفاده شد.

آزمون MTT: برای بررسی اثر سمیت عصاره گیاه *Artemisia absinthium*، داروی فلوروآوراسیل و کاربرد توأم آن‌دو و تعیین میزان بقای سلولی در سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی رده ASPC-1 از آزمون MTT استفاده شد (۲۶). ابتدا تعداد 3×10^3 عدد، از سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی رده ASPC-1؛ در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد، بعد از گذشت زمان مناسب از کشت سلول‌ها و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت؛ سلول‌ها را با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰ و ۵۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه *Artemisiaabsinthium* و با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار از داروی فلوروآوراسیل تیمار شد. بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ درصد MTT را به سلول‌ها اضافه شد، سپس پلیت کشت سلول‌ها به‌مدت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. تمامی مراحل فوق در تاریکی انجام شد. بعد از گذشت این مدت، مایع رویی سلول‌ها را خارج کرده و مقدار ۸۰ میکرولیتر، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به سلول‌ها اضافه شد. سپس پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفوتومتر "EPOCH" منتقل و میزان جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. لازم به‌ذکر است از محیط کشت دارای سلول بدون حضور تیمارها به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. پس از تعیین میزان IC50 و تعیین غلظت‌های موثر عصاره و دارو، تاثیر کاربرد توأم عصاره و دارو انجام شد. برای تعیین و بررسی اثر کاربرد توأم عصاره *Artemisiaabsinthium* و داروی فلوروآوراسیل، بعد از کشت سلول‌های ASPC-1، به‌صورت همزمان با غلظت‌های ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به‌همراه غلظت‌های ۲، ۴، ۸ میکرومولار از دارو تیمار صورت گرفت.

گروه‌های آزمون: براساس نتایج تست MTT گروه بندی به‌صورت زیر انجام شد:

در گروه شاهد سلول‌ها تیماری دریافت نکردند. در گروه آرتمیسیا سلول‌ها با غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آرتمیسیا تیمار شدند. در گروه فلوروآوراسیل سلول‌ها با غلظت ۱۶ میکرومولار از داروی فلوروآوراسیل تیمار شدند و همچنین در گروه توأم آرتمیسیا+ فلوروآوراسیل سلول‌ها با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره و ۴ میکرومولار از داروی فلوروآوراسیل تیمار شدند.

آزمون Annexin V-FITC: به‌منظور تعیین نوع مرگ سلولی از کیت تشخیص آپوپتوزیس (Annexin V-UK, Abcam) FITC/PI استفاده شد. طبق دستورالعمل سازنده کیت، سلول‌ها پس از تیمار، توسط سانتریفیوژ دور ۳۰۰۰g جمع‌آوری و در بایدینگ بافر معلق شدند. سپس ۲ میکرو لیتر Annexin V-FITC و ۱ میکرو لیتر PI برای آنالیز فلوسیتومتری اضافه شد (۲۷).

تکنیک *Rael-time PCR*: تعداد 1×10^6 سلول در فلاسک کوچک کشت داده شد و بعد از گذشت زمان مناسب، جهت بررسی بیان ژن‌های مورد نظر توسط Real-time PCR، در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد؛ استخراج RNA در شرایط عاری از RNase و DNase توسط کیت pars tous طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد و غلظت RNA به دست آمده در فرایند استخراج RNA به صورت کمی محاسبه شد. سنتز cDNA توسط نسخه برداری معکوس از RNA توسط کیت شرکت pars tous انجام شد (همچنین یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌های مورد مطالعه طراحی و سنتز شد. سپس PCR Real-Time با استفاده از SYBRGreen PCR Master Mix انجام شد. تغییرات در میزان بیان ژن‌ها در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد در سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی رده AsPC-1 توسط دستگاه "Bio-Rad CFX96 RT-PCRs" و نرم افزار "Bio-Rad CFX Manager" بررسی شد. سطح بیان ژن های BAX، Caspase 3 و 9 توسط ژن GAPDH و سطح بیان miR34a توسط ژن U6 نرمال سازی شد (توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Rael-time PCR مطابق جدول شماره ۱ می‌باشد).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش

Gene	Sens	Antisense	TM
GAPDH	TGA CTT CAA CAG CGA CAC C	TTG CTG TAG CCA AAT TCG TT	۵۵
Caspase 3	AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG	GTT CAT CCA GTC GCT TTG TGC	۵۸
Caspase 9	CCA GAG ATT CGC AAA CCA GAG	CAA TGT GAA CTT CTG CCG TGA	۵۸
BAX	TTT GCT TCA GGG TTT CAT CCA	CTC CAT GTT ACT GTC CAG TTC GT	۶۱
U6	AAG GAT GAC ACG CAA AT	Universal primer	۶۰
miR34a	AGG GTG GCA GTG TCT TAG C	Universal primer	۶۰

۳- آنالیز آماری

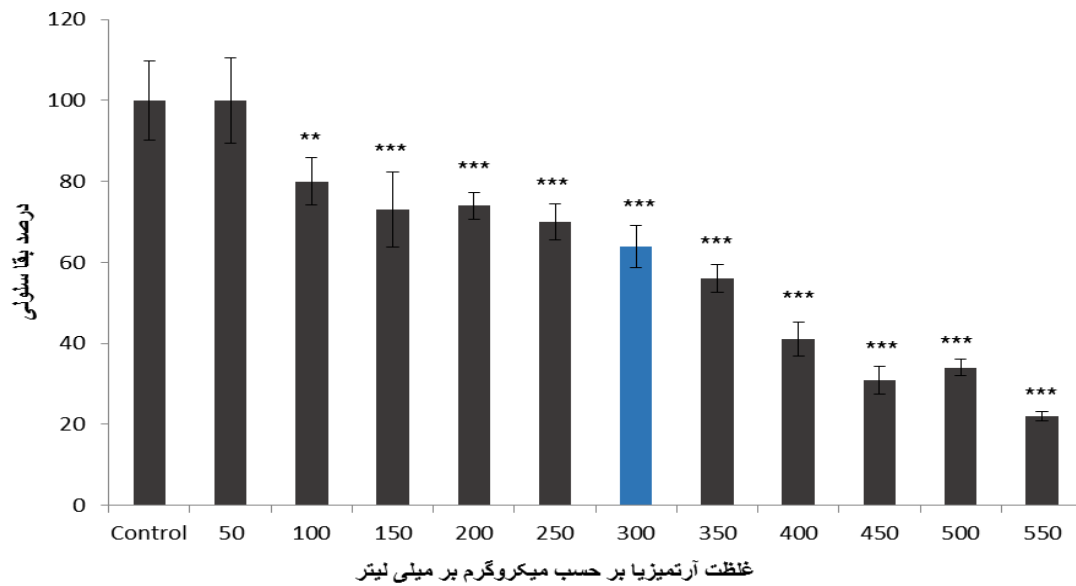
داده‌های آماری حاصل از این مطالعه، در نرم‌افزار "Prism" نسخه ۸ و به کمک آزمون آماری One-way ANOVA در سطح معنی‌داری " $p < 0.05$ " تجزیه و تحلیل شدند. کلیه نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شده‌اند. کلیه‌ی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار، برای اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی، انجام شد.

۴- نتایج

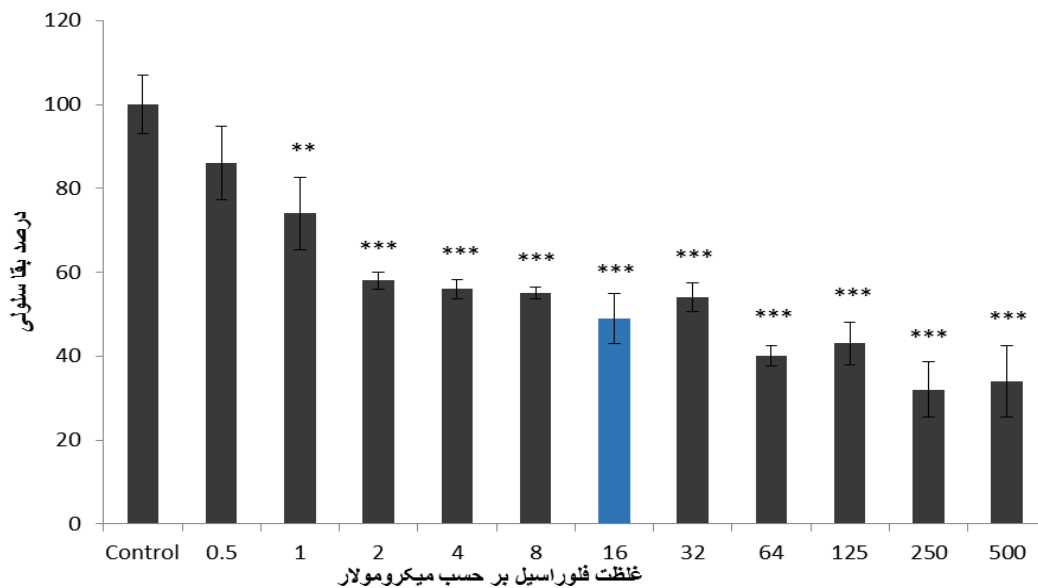
نتایج آزمون MTT

میزان بقای سلول‌های سرطانی رده AsPC-1 در گروه‌های تیماری (عصاره *Artemesia* و داروی فلوروآراسیل) به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌یابد و همچنین اثر هم‌افزایی عصاره *Artemesia* و فلوروآراسیل تاثیر بیشتری بر کاهش درصد بقای سلول‌ها در مقایسه با زمانی که هر کدام را به صورت جداگانه استفاده شد، می‌گذارد (نمودارهای ۱، ۲، ۳). براساس نتایج تست MTT مقدار IC50 برای عصاره *Artemesia* غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای داروی

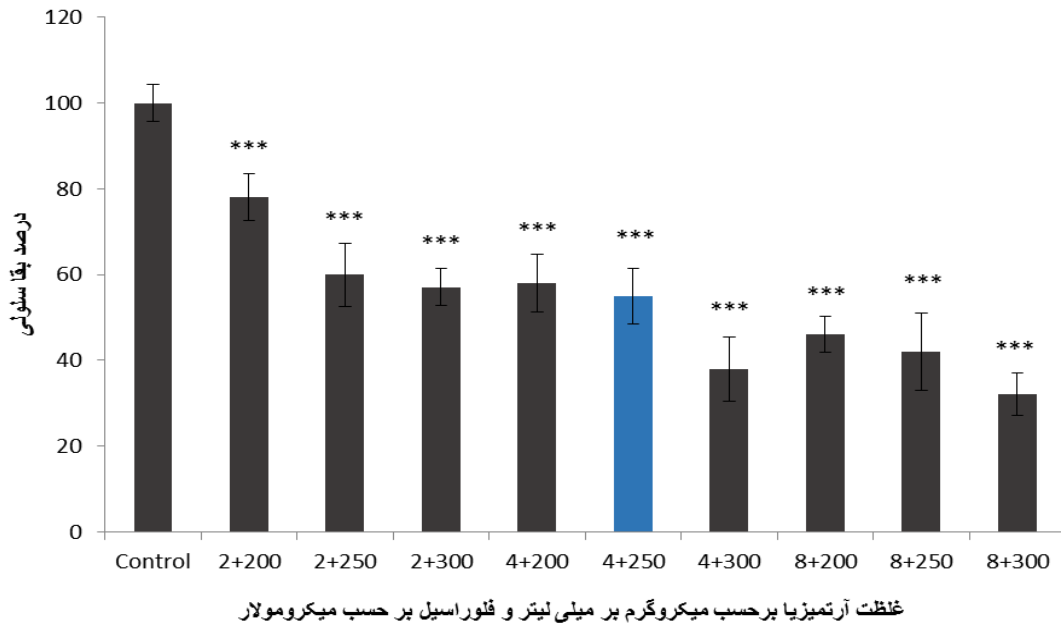
فلورواوراسیل، غلظت ۱۶ میکرومولار و برای اثر هم افزایی غلظت ۴ میکرومولار برای داروی فلورواوراسیل به همراه غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره *Artemisia*، می‌باشد.



نمودار ۱: بررسی زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT. نتایج آزمون MTT در حضور غلظت‌های مختلف آرتیمیزیا بر روی رده سلولی Aspc-1 ۲۴ ساعت پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین \pm SD نمایش داده شده است. $p < 0.05^*$ ، $p < 0.01^{**}$ و $p < 0.001^{***}$ اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد). *Artemisia* (IC50=350μg/ml).



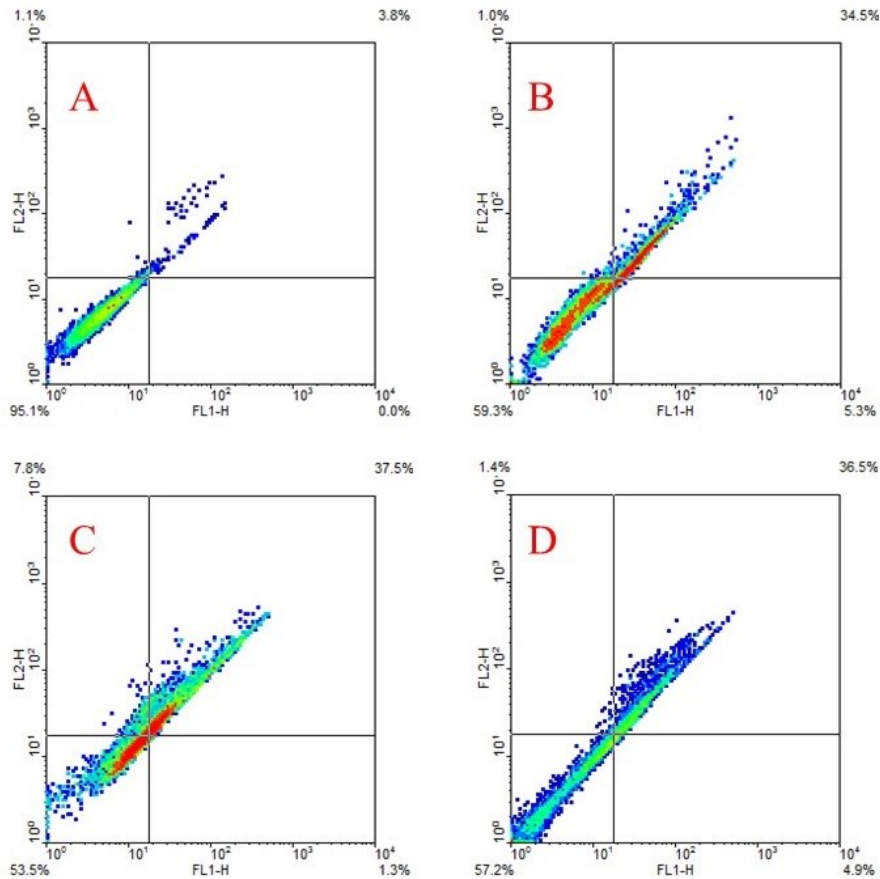
نمودار ۲: بررسی زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT. نتایج آزمون MTT در حضور غلظت‌های مختلف فلورواوراسیل روی رده سلولی Aspc-1 ۲۴ ساعت پس از تیمار (داده‌ها به صورت میانگین \pm SD نمایش داده شده است. $p < 0.05^*$ ، $p < 0.01^{**}$ و $p < 0.001^{***}$ اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد). IC50=16μmol(Fluorouracil).



نمودار ۳: بررسی زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT. نتایج آزمون MTT در حضور غلظت‌های مختلف فلورواوراسیل + آرتمیسیا روی رده سلولی Aspc-1. (داده‌ها به صورت میانگین \pm SD نمایش داده شده است. $p < 0.05^*$ ، $p < 0.01^{**}$ و $p < 0.001^{***}$ اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد). $(IC_{50}=250\mu g/ml(\text{Artemisia}) + 4\mu mol(\text{Fluorouracil}))$

تست Annexin

سلول‌های AsPC-1 در گروه‌های تیماری مختلف دچار آپوپتوزیس شده است به طوری که در گروه شاهد در حدود ۹۵ درصد سلول‌ها زنده می‌باشد و حدود ۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس شده‌اند، در گروه تیماری *Artemisia* با غلظت $absinthium$ $IC_{50}=350\mu g/ml$ در حدود ۴۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس شده و در حدود ۵۹ درصد سلول‌ها زنده بودند، در گروه تیماری داروی *Fluorouracil* با غلظت $IC_{50}=16\mu mol$ در حدود ۳۹ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس شده‌اند و در حدود ۵۳ درصد سلول‌ها زنده می‌باشند و در گروه تیماری هم‌افزایی عصاره *Artemisia* و *Fluorouracil* در غلظت $(IC_{50}=250\mu g/ml(\text{Artemisia}) + 4\mu mol(\text{Fluorouracil}))$ ، در حدود ۴۲ درصد از سلول‌های سرطانی، دچار آپوپتوزیس شده‌اند و در حدود ۵۷ درصد از سلول‌ها زنده هستند (شکل ۱).

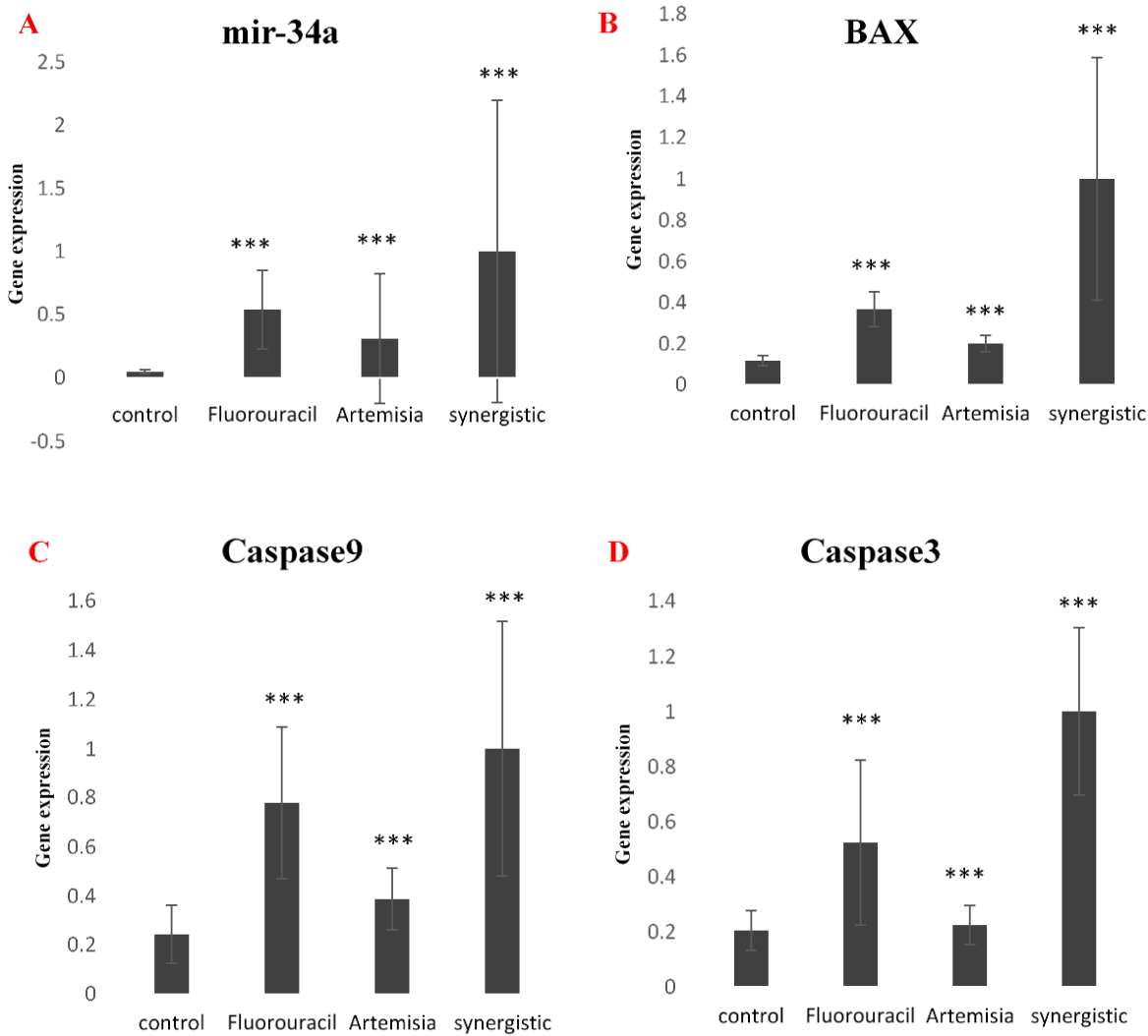


شکل ۱: بررسی درصد آپوپتوزیس توسط رنگ آمیزی Annexin V- FITC/ PI. در گروه شاهد در حدود ۹۵ درصد سلول‌ها زنده می باشند، ۰ درصد سلول‌ها آپوپتوزیس اولیه و ۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس ثانویه شده‌اند و همچنین ۱/۱ درصد نکروزیس مشاهده شد (A). در گروه تیماری Artemisia ۵۹ درصد سلول‌ها زنده می‌باشند، ۵/۳ درصد سلول‌ها آپوپتوزیس اولیه و ۴۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس ثانویه شده‌اند و همچنین ۱ درصد نکروزیس مشاهده شد (B). در گروه تیماری Fluorouracil ۵۳ درصد زنده هستند، ۱/۳ درصد سلول‌ها آپوپتوزیس اولیه و ۳۷/۵ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس ثانویه شده‌اند و همچنین ۷/۸ درصد نکروزیس مشاهده شد (C). در گروه تیماری هم افزایی Fluorouracil+Artemisia ۵۷ درصد سلول‌ها زنده می‌باشند، ۴/۹ درصد سلول‌ها آپوپتوزیس اولیه و ۳۶/۵ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوزیس ثانویه شده‌اند و همچنین ۱/۴ درصد نکروزیس مشاهده شد (D).

بررسی بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real Time PCR

بررسی بیان ژن‌های Caspase 3 و Caspase 9, BAX, miR-34a توسط تکنیک Real Time PCR

همچنین miR-34a، در سرطان پانکراس کاهش پیدا می‌کند و رفتاری شبیه به ژن‌های آپوپتوزیسی دارد و نتایج حاصل از تکنیک Real-time PCR نشان می‌دهد که بیان miR-34a در گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه شاهد افزایش بیان معنی‌دار پیدا کرده است ($p < 0.001$). (شکل A۲). همچنین سطح بیان ژن‌های Caspase 3 و Caspase 9, BAX در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد افزایش بیان معنی‌دار نشان دادند ($p < 0.001$). (شکل B, C, D). این موضوع نشان دهنده توانایی این ترکیب در افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزیسی و miR-34a و در نتیجه القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است.



شکل ۲: الگوی تغییرات بیان ژنهای miR-34a, BAX, Caspase 9 و Caspase 3 توسط تکنیک Real Time PCR. (مقدار $p < 0.001$) (***) نشان دهنده تفاوت معنی داری در مقایسه با گروه شاهد است.

۵- بحث

در این مطالعه تجربی برای اولین بار اثر هم‌افزایی عصاره تام متانولی *Artemisia absinthium* و فلورووراسیل بر روی سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی "AsPC-1" و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزیسی "BAX, Caspase 3, Caspase 9" و miR-34a بررسی شد. برای انجام این پژوهش بعد از تهیه‌ی گروه‌های تیماری (عصاره *Artemisia absinthium* و داروی فلورووراسیل و کاربرد توام عصاره و دارو)، برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن‌ها از آزمون MTT استفاده شد. برای بررسی نوع مرگ سلولی در سلول‌های تحت تیمار از فلوسیتومتری استفاده شد و در نهایت برای بررسی تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزیسی "BAX, Caspase 3, Caspase 9" و miR-34a از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از آزمون MTT نشان داد که

عصاره *Artemisia* و فلورواوراسیل می‌توانند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش بقای سلول‌های سرطانی پانکراس شوند و بهترین نتیجه زمانی بود که عصاره *Artemisia* و فلورواوراسیل به صورت هم افزایی برای تیمار سلول‌ها استفاده شد. براساس این نتایج اثر هم افزایی عصاره *Artemisia* و فلورواوراسیل نقش بیشتری بر مهار رشد سلول‌های سرطانی نسبت به زمانی که از عصاره آرتمیسیا و فلورواوراسیل به تنهایی و جداگانه استفاده کردیم، دارد. Dong و همکاران (۲۸)، اثر گیاه *Geissospermum* (PaoPereira *vellosii*) را در برابر دودمان‌های مختلف سرطان پانکراس آزمایش کردند و نشان دادند که عصاره این گیاه تکثیر سلول‌های سرطانی را به صورت وابسته به غلظت مهار می‌کند. طبق نتایج مطالعه حاضر عصاره (*Artemisia absinthium*) به صورت وابسته به غلظت تکثیر سلول‌های سرطانی پانکراس را مهار می‌کند. Nokhandani و همکاران (۲۹)، به بررسی این موضوع که آیا ترکیب ۵-فلورواوراسیل و لیپوپولی ساکارید به طور هم افزایی باعث ایجاد سمیت سلولی و آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان سینه انسان رده ی MCF-7 می‌شود، پرداختند. نتایج این مطالعه پس از انجام تست MTT نشان داد که LPS به تنهایی تاثیر قابل توجهی بر سمیت سلولی در مقایسه با سلول‌های شاهد ندارد، در حالی که همراه با FU-5 باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی می‌شود. مطالعه پیش رو نیز این موضوع را تایید می‌کند که داروی فلورواوراسیل به طور وابسته به غلظت، درصد بقای سلولی را کاهش می‌دهد. نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان داد؛ در حالی که درصد آپوپتوزیس در سلول‌های گروه شاهد ۴ درصد می‌باشد، این میزان در سلول‌های تیمار شده با عصاره *Artemisia absinthium* به ۴۰ درصد، در سلول‌های تیمار شده با فلورواوراسیل به ۳۹ درصد و در سلول‌های تیمار شده با ترکیب هم‌افزایی عصاره *Artemisia absinthium* و فلورواوراسیل به ۴۳ درصد، افزایش داشته است. در نتیجه می‌توان گفت که اثر هم‌افزایی عصاره *Artemisiaabsinthium* و فلورواوراسیل توانایی خوبی برای القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پانکراس انسانی دارد. Lang و همکاران (۳۰) در پژوهشی به فعالیت ضد توموری عصاره گیاهی درمنه آنوآ و شناسایی مواد موثره آن پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش پس از انجام تست Annexin نشان داد که عصاره گیاهی *Artemisia annua* فعالیت ضد سرطانی قوی در برابر سرطان سینه انسان نشان می‌دهد و باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج پژوهش حاضر نیز این موضوع را تایید می‌کند که عصاره *Artemisia absinthium* باعث افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود. Park و همکاران (۳۱) به بررسی پاسخ سلول‌های سرطانی کولون به آسیب DNA ناشی از ۵-فلورواوراسیل پرداختند. نتایج این مطالعه پس از انجام تست Annexin نشان داد که ۵-فلورواوراسیل باعث آسیب به DNA می‌شود و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کولون را به دنبال دارد. تحقیقات حاضر نیز این موضوع را تأیید کرد که داروی فلورواوراسیل، آپوپتوزیس را افزایش داده است.

نتایج حاصل از بیان ژن نشان داد که بیان ژن‌های آپوپتوزیسی BAX، Caspase3، Caspase9 و miR-34a در گروه‌های تیماری (عصاره، فلورواوراسیل و هم‌افزایی عصاره-دارو) در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرده است و این افزایش در گروه هم‌افزایی بیشتر از دو گروه تیماری دیگر است؛ در نتیجه آپوپتوزیس افزایش یافته است.

Al-Menhali و همکاران (۳۲) اثر عصاره گیاه *Thymus vulgaris* را بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی کولون بررسی کردند. نتایج آن‌ها پس از انجام تست Real-time PCR نشان داد که عصاره این گیاه می‌تواند باعث افزایش آپوپتوزیس همراه با افزایش فعالیت کاسپازها در سلول‌های سرطانی کولون شود. نتایج مطالعه حاضر نیز همسو با نتایج این پژوهش است و در پژوهش حاضر نیز میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

Jiexiao و همکاران (۳۳) در پژوهشی به بررسی این موضوع که آیا microRNA-137 رشد تومور سلول‌های سرطانی پانکراس، تهاجم و حساسیت به شیمی‌درمانی را تعدیل می‌کند، پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که miR-137 در رده‌های سلولی سرطان پانکراس و سلول‌های تومور بیماران به‌طور قابل توجهی کمتر بیان شده است و تهاجم سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند و حساسیت به معرف شیمی‌درمانی ۵-Fu را افزایش می‌دهد. در نتیجه miR-137 نقش مهمی در ایجاد سرطان پانکراس دارد. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که اثر هم‌افزایی عصاره *Artemisia absinthium* و داروی فلوروووراسیل توانست مقدار بیان miR-34a و آپوپتوزیس را افزایش دهد. در همین راستا، Gao و همکاران (۲۶) سلول‌های سرطانی کولون رده SW620 را با فلوروووراسیل تیمار کردند. نتایج تست‌های آزمایشگاهی نشان داد که تیمار سلول‌ها با فلوروووراسیل منجر به القای آپوپتوزیس در سلول‌های SW620 می‌شود. همچنین افزایش درصد سلول‌ها در فاز S نیز در میان سلول‌های SW620 تحت درمان با فلوروووراسیل مشاهده شد. Lian و همکاران (۲۷) فعالیت ضد سرطان عصاره گیاه *Artemisia vulgaris* (mugwort) را در برابر رده سلولی HCT-15 (سرطان کولون انسانی) بررسی کردند و نشان دادند که عصاره این گیاه به‌صورت وابسته به غلظت دارای اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی است و باعث مهار تکثیر این سلول‌ها می‌شود. Dong و همکاران (۲۸) اثر گیاه *Pao Pereira* (Geissospermum vellosii) را در برابر دودمان‌های مختلف سرطان پانکراس آزمایش کردند و نشان دادند که عصاره این گیاه تکثیر سلول‌های سرطانی را به‌صورت وابسته به غلظت مهار می‌کند.

۶- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اثر هم‌افزایی عصاره *Artemisia absinthium* و فلوروووراسیل باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پانکراس رده AsPC-1 شده است و همچنین باعث افزایش میزان آپوپتوزیس می‌شود. همچنین بیان ژن‌های آپوپتوزیسی در گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است و این نشان دهنده افزایش میزان آپوپتوزیس در گروه‌های تیماری است.

۷- تشکر و قدردانی

از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی که در انجام این پژوهش تجربی همکاری داشتند صمیمانه تشکر می‌شود.

۸- منابع

- Ahmad G, Amiji MM. Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies. *Expert Opin Drug Deliv.*2017; 14(8):997-1008.
- Karpuz M, Silindir-Gunay M, Ozer AY. Current and Future Approaches for Effective Cancer Imaging and Treatment. *Cancer Biother Radiopharm.*2018; 33(2):39-51.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*2021; 71(3):209-249.

4. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024 May;74(3):229-63.
5. Noori-Dalooi M, Sadr Z. Cancer immunotherapy: Use the immune system to fight cancer. *JSUMS*.2019; 3(2): 30-47. (Persian)
6. Noori-Dalooi M, Kashani B. Targeted cancer therapy: review article. *Tehran Univ Med J*.2018;76(4):231-240. (Persian)
7. Salem AA, Mackenzie GG. Pancreatic cancer: A critical review of dietary risk. *Nutr Res*.2018; 52:1-13.
8. Del Chiaro M, Segersvärd R, Lohr M, Verbeke C. Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today?. *World J Gastroenterol*.2014; 20(34):12118-12131.
9. Khan MA, Azim S, Zubair H, Bhardwaj A, et al. Molecular Drivers of Pancreatic Cancer Pathogenesis: Looking Inward to Move Forward. *Int J Mol Sci*.2017; 18(4):1-25.
10. Grasso C, Jansen G, Giovannetti E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. *Crit Rev Oncol Hematol*.2017; 114:139-152.
11. Vorvis C, Koutsioumpa M, Iliopoulos D. Developments in miRNA gene signaling pathways in pancreatic cancer. *Future Oncol*.2016; 12(9):1135-1150.
12. Veisani Y, Jenabi E, Khazaei S, Nematollahi S. Global incidence and mortality rates in pancreatic cancer and the association with the Human Development Index: decomposition approach. *Public Health*.2018; 156:87-91.
13. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*.2020; 206:107447.
14. Baharara J, Amini E, Nikdel N, Salek-Abdollahi F. The Cytotoxicity of Dacarbazine Potentiated by Sea Cucumber Saponin in Resistant B16F10 Melanoma Cells through Apoptosis Induction. *Avicenna J Med Biotechnol*.2016; 8(3):112-119.
15. Shafieipour S, Zamanian Y, Hadipour E, Sinaei R, et al. Exploring the effects of alpha-pinene on apoptosis induction in human colon cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway: an in vitro study. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2025 Feb 11;26(1):27.
16. Dou H, Yu PY, Liu YQ, Zhu Y, et al. Recent advances in caspase-3, breast cancer, and traditional Chinese medicine: a review. *Journal of Chemotherapy*. 2024 Jul 3;36(5):370-88.
17. Lak Mazaheri E, Niknejad A, Amini E, Nabiuni M. Phoenix dactylifera L. Pollen and Fluvoxamine Maleate Protect PC12 Cells Against H2O2-Induced Oxidative Stress by Involvement of Nrf2 and SIGMAR1 Gene Expression. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*.2023;19(1):e141738.
18. Zyad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou MA, et al. More insights into the pharmacological effects of artemisinin. *Phytother Res*.2018;32(2):216-229.
19. An Y, Sun JX, Ma SY, Xu MY, et al. From plant based therapy to plant-derived vesicle-like nanoparticles for cancer treatment: past, present and future. *International Journal of Nanomedicine*. 2025 Dec 31:3471-91.
20. Taleghani A, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Artemisia: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem*.2020; 28(1):1-22.

21. Martínez-Díaz RA, Ibáñez-Escribano A, Burillo J, Heras Lde L, et al. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2015; 110(5):693-699.
22. Ali M, Abbasi BH, Ahmad N, Khan H, et al. Strategies to enhance biologically active-secondary metabolites in cell cultures of *Artemisia* - current trends. *Crit Rev Biotechnol*.2017; 37(7):833-851.
23. Zare Mongabadi M, Farhadi M, Torabzadeh khorasani P, Hedaiati M. Comparison apoptotic effects of Iranian *Artemis* (*Artemisia scoparia* and *sieberi*) with Taxol on SK _BR3 breast cancer cell line. *RJMS*. 2018;25(7):70-80. (Persian)
24. Pargol M, Zare Karizi S, Karimi Pour M. Evaluation of MiR-20a and MiR-204 Expression Involved in Autophagy in Non-small Cell lung Cancer. *J Ilam Uni. Med. Sci*.2019; 26(6):58-68. (Persian)
25. Wang H, Jiao H, Jiang Z, Chen R. Propofol inhibits migration and induces apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells through miR-34a-mediated E-cadherin and LOC285194 signals. *Bioengineered*.2020; 11(1):510-521.
26. Rastgar Z, Khosravinejad F. Investigating the effect of cytotoxicity of nanonosome containing the extract of *Artemisia annua* on breast cancer cell lines. *Feyz Medical Sciences Journal*. 2023 Mar 10;27(1):1-1.
27. Hasani S, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Selenium Nanoparticles Toward HT29 Colon Cancer Cells. *Cell and Tissue Journal*. 2024 Sep 22;15(3):190-202.
28. Dong R, Chen P, Chen Q. Extract of the Medicinal Plant *Pao Pereira* Inhibits Pancreatic Cancer Stem-Like Cell In Vitro and In Vivo. *Integr Cancer Ther*.2018; 17(4):1204-1215.
29. Nokhandani N, Naghavi Alhosseini M, Memarian A, Davoodi H. Combination of 5-fluorouracil and Lipopolysaccharide Synergistically Induces Cytotoxicity and Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol*.2020;19(4): 426-436.
30. Lang S, Schmiech M, Hafner S, Paetz Ch, et al. Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. *Phytomedicine*.2019;62: 152962.
31. Park SR, Namkoong S, Friesen L, Cho CS, et al. Single-Cell Transcriptome Analysis of Colon Cancer Cell Response to 5-Fluorouracil-Induced DNA Damage. *Cell Rep*.2020;32(8): 108077
32. Al-Menhali A, Al-Rumaihi A, Al-Mohammed H, Al-Mazrooey H, et al. *Thymus vulgaris* (thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *J Med Food*.2015; 18(1): 54-59.
33. Xiao J, Peng F, Yu Ch, Wang M, et al. microRNA-137 modulates pancreatic cancer cells tumor growth, invasion and sensitivity to chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol*.2014; 7(11):7442-7450.