

بررسی اثر هم‌افزایی عصاره *Artemisia absinthium* و Taxol روی سلول‌های سرطانی معده (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی و متاستازی

فیروزه فروغی^۱، جواد بهارآرا^{۱،۲*} و خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۱

^۱ ایران، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۴

چکیده

سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان به شمار می‌رود. *Artemisia absinthium* از گونه‌های مهم گیاهان جنس *Artemisia* است که دارای خواص ضد التهابی و ضد ویروسی می‌باشد. در مطالعه حاضر توانایی عصاره متانولی *A. absinthium* به تنهایی و در ترکیب با تاکسول بر روی القای آپوپتوز و مهار مهاجرت سلولی در رده سلولی AGS (دودمان سرطان معده انسانی) بررسی شده است. برای بررسی اثر سیتوتوکسیک کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* با تاکسول بر روی تکثیر سلول‌های AGS از آزمون MTT استفاده شد؛ جهت بررسی آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار از رنگ آمیزی DAPI و آنالیز فلوسایتومتری و برای بررسی اثر ضد تهاجمی از تست مهاجرت سلولی استفاده شد؛ تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "p53 – Caspase-3,9" و متاستازی "MMP-2,9" با تکنیک Real-time PCR بررسی شد. داده‌های کمی حاصل توسط آزمون آماری "ANOVA" در سطح معنی داری " $p < 0.05$ " تحلیل گردید. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که ترکیب عصاره *A. absinthium* با تاکسول تکثیر سلول‌های سرطانی AGS را به صورت وابسته به غلظت مهار می‌کند، مشاهدات مورفولوژیک حاصل از روش DAPI و نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیماری بود؛ نتایج تست مهاجرت سلولی کاهش پتانسیل تهاجمی سلول‌های AGS را نشان داد. نتایج Real-time PCR بیان‌گر افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی و کاهش ژن‌های متاستازی در گروه‌های تیماری ($p < 0.05$) بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* با تاکسول، تکثیر سلول‌های رده AGS را مهار می‌کند و باعث القای آپوپتوز و مهار توانایی مهاجرت در این سلول‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده؛ *Artemisia absinthium*؛ تاکسول؛ آپوپتوز؛ متاستاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲، پست الکترونیکی: baharara78@gmail.com

مقدمه

صورت خود مختار تولید می‌کنند و به آن‌ها پاسخ می‌دهند و از طرفی به سیگنال‌های مهاری و آپوپتوتیک رسیده به سلول سرطانی پاسخ نمی‌دهند؛ این عملکرد در سلول‌های سرطانی منجر به رشد نامحدود و تکثیر بی‌رویه سلول‌ها می‌شود (۱۲). این ویژگی‌های منحصر به فرد سلول‌های سرطانی باعث پخش شدن سلول‌ها در

مسیرهای سلولی و مولکولی در انواع مختلف سرطان‌ها متفاوت هستند، اما همه انواع سرطان دارای ویژگی‌های مشابه می‌باشند، که به عنوان نشانه‌های اصلی سرطان شناخته می‌شوند؛ سلول‌های سرطانی توانایی متاستاز، آنژیوژنز (رگ‌زایی)، تهاجم و حمله به سلول‌ها و بافت‌های مجاور را دارند؛ این سلول‌ها سیگنال‌های رشد را به

از مکان اولیه خود حرکت کرده و به سایر نقاط بدن مهاجرت کنند (۱۸).

سرطان معده یک بیماری با علت پیچیده است که شامل تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعدد است؛ در حال حاضر شواهدی وجود دارد که جهش در تعدادی از ژن‌ها با افزایش خطر ابتلا به سرطان معده مرتبط است؛ سرطان معده در جهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ و میر ناشی از ابتلا به سرطان شناخته شده است (۴ و ۵)؛ این سرطان اولین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در ایران می‌باشد؛ سرطان معده بیشترین بروز را در مردان و سومین رتبه را در میان زنان پس از سرطان‌های سینه و کولون (روده بزرگ) دارد (۴). با وجود پیدایش تکنیک‌های پیشرفته در عمل‌های جراحی سرطان معده، هنوز هم سرطانی‌گشونده و خطرناک به حساب می‌آید، حدود ۹۰ درصد از تومورهای معده بدخیم می‌باشند؛ همچنین این نوع سرطان مقاومت بالایی نسبت به داروهای شیمی‌درمانی ایجاد می‌کند، در نتیجه استراتژی‌های درمانی مؤثر واقع نمی‌شوند و نتایج مورد انتظار بالینی حاصل نمی‌شوند (۱۶).

تاکسول از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی می‌باشد؛ تاکسول (با نام عمومی پاکلیتاکسل) یک ترکیب دی‌ترپنی با ساختاری پیچیده می‌باشد، که فعالیت ضد توموری قابل توجهی دارد؛ تاکسول یک ترکیب ضد سرطانی با منشأ گیاهی می‌باشد که از پوست درخت سرخدار با نام علمی "*Taxus brevifolia*. L" به دست می‌آید (۱). تاکسول از دپلمریزه شدن میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌کند در نتیجه باعث می‌شود که تجمعات توبولین به صورت یک ساختار پایدار درآیند که باعث ایجاد ثبات در میکروتوبول‌ها و ناکارآمدی آن‌ها می‌شود، که این امر در نهایت باعث توقف چرخه سلولی در اواخر فاز G2/M و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱ و ۱۴).

سراسر بدن و آسیب رساندن به بافت‌ها و دشوارتر شدن روند درمان می‌شوند (۱۲). بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان دومین علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و در ایران نیز سومین عامل مرگ و میر به حساب می‌آید (۴ و ۵)؛ همچنین تخمین زده می‌شود در سال ۲۰۳۵ تعداد موارد گزارش ابتلا به سرطان، در حدود ۷۰ درصد افزایش داشته باشد (۳).

در شرایط پاتولوژیک، به ویژه سرطان، سلول‌ها توانایی خود را برای مرگ ناشی از آپوپتوز از دست می‌دهند که این امر منجر به تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی می‌شود؛ سلول‌های سرطانی غالباً دارای بیان بیش از حد بسیاری از پروتئین‌هایی هستند که نقش مهمی در مقاومت در برابر فعال شدن آپوپتوتیک دارند، مکانیسم‌های مختلف باعث می‌شود سلول‌ها از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فرار کنند و در مقابل مولکول‌های ضد آپوپتوزی را بیش از حد بیان کنند (۱۸). در نتیجه امروزه بسیاری از استراتژی‌های درمانی بر اساس راه‌اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی استوار است (۶).

متاستاز فرآیندی است که در طی آن سلول‌های سرطانی از تومور اولیه منتشر شده و در محل دیگری غیر از محل تومور اولیه رشد می‌کنند؛ جابه‌جایی سلول‌های سرطانی به قسمت‌های دیگر بدن (متاستاز)، دلیل اصلی مرگ و میرهای ناشی از سرطان (حدود ۹۰ درصد مرگ ناشی از سرطان) است (۱۸). متاستاز شامل مراحل جدایی، مهاجرت، تهاجم و چسبندگی است و توسط مسیرهای مختلف سیگنالینگ تنظیم شده و تحت تأثیر ماتریکس خارج سلولی اطراف قرار دارد؛ جهش‌های ایجاد شده در سلول‌های سرطانی می‌توانند، فعالیت آنزیم‌های دخیل در تهاجم و مولکول‌های درگیر در اتصالات سلول به سلول و سلول به ماده زمینه‌ای خارج سلولی را تغییر دهند، که این امر به سلول‌های سرطانی این امکان را می‌دهد که بتوانند

آپوپتوز در سلول‌های سرطانی سینه؛ دودمان‌های MDA-MB-231 و MCF-7 پرداختند، نتایج این مطالعات نشان دهنده اثرات ضد تکثیر عصاره *A. absinthium* بر روی سلول‌های سرطانی و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی در هر دو رده سلولی بود (۱۷). Choi و Kim در سال ۲۰۱۳؛ اثر عصاره متانولی هشت گونه مختلف *Artemisia* را بر روند تکثیر سلول‌های سرطانی سینه انسانی رده MCF-7 بررسی کردند و نشان دادند که عصاره تمام هشت گونه *Artemisia* باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲). در سال ۲۰۱۸؛ Lian و همکاران فعالیت ضد سرطانی عصاره گیاه "*Artemisia vulgaris* (mugwort)" در برابر رده سلولی HCT-15 (سرطان کولون انسانی) بررسی کردند و نشان دادند که عصاره این گیاه به صورت وابسته به غلظت دارای اثر سمیت بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشد و باعث مهار رشد این سلول‌ها می‌شود (۱۱).

هدف از این پژوهش تجربی؛ بررسی اثر هم‌افزایی عصاره *A. absinthium* و تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی معده انسانی (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی "Caspase 9 - Caspase 3 - p53" و متاستازی "MMP-9 - MMP-2" می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه و کشت سلول‌های رده AGS: رده سلولی AGS (سلول‌های سرطانی معده انسانی) از انستیتو پاستور ایران (NCBI Code: C131) تهیه شد و در محیط کشت RPMI "BIO-IDEA; Iran" حاوی ۱۰ درصد FBS "Gibco; USA" و یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین-پنی سیلین "BIO-IDEA; Iran"؛ در فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی؛ کشت داده شد.

تهیه عصاره متانولی گیاه *A. absinthium*: گیاه *A. absinthium* (FUMH) با کد شناسایی ۴۵۹۵۲ از هرباریوم

گیاهان طیف گسترده‌ای از ترکیبات شیمیایی را تولید می‌کنند که به این ترکیبات متابولیت ثانویه گفته می‌شود؛ آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، رنگدانه‌ها و تانن‌ها مهم‌ترین این ترکیبات هستند؛ این متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات بیولوژیکی متنوعی مانند اثرات ضد التهابی، ضد سرطانی و غیره می‌باشند؛ اعتقاد بر این است که اثرات ضد سرطانی گیاهان با سرکوب آنزیم‌های تحریک‌کننده سرطان، ترمیم DNA، تحریک تولید آنزیم‌های ضد تومور در سلول، افزایش ایمنی بدن و القای اثرات آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود (۱۰)؛ از این رو به کارگیری ترکیبات طبیعی همچون گیاهان دارویی به منظور مهار فرآیند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی؛ امروزه به عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان است که دارای اثرات جانبی و هزینه کمتری می‌باشند مطرح شده است (۱۰).

گیاهان جنس *Artemisia* (درمنه) متعلق به خانواده Compositae (Asteraceae) (خانواده کاسنی‌ها) یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی می‌باشد؛ که از حدود ۵۰۰ گونه در سراسر جهان تشکیل شده است، در ایران ۳۴ گونه شناخته شده از *Artemisia* وجود دارد؛ *A. absinthium* از جمله گونه‌های مهم این جنس است (۱۳ و ۱۹). گیاهان جنس *Artemisia* و ترکیبات فعال حاصل از آن؛ به عنوان داروهای ضد سرطانی، ضد مالاریا، آنتی‌اکسیدانی، سیتوتوکسیک، ضد اسپاسم، ضد التهابی، ضد میکروبی و غیره بررسی شده‌اند؛ تحقیقات نشان داده است که عصاره برخی از گونه‌های *Artemisia* دارای فعالیت سیتوتوکسیکی و اثر آپوپتوزی در شرایط آزمایشگاهی در برابر رده‌های سلولی سرطانی و مدل‌های حیوانی سرطانی می‌باشد و در مقابل دارای سمیت کم و حتی بی‌تأثیر در برابر سلول‌های طبیعی می‌باشد (۱۳ و ۱۹).

در این راستا؛ Shafi و همکاران در سال ۲۰۱۲؛ به بررسی نقش عصاره *A. absinthium* در مهار تکثیر سلولی و القاء

MTT "Sigma-Aldrich; USA" به محیط سلول‌ها اضافه شد، سپس پلیت کشت سلول‌ها برای مدت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد؛ سپس، مایع رویی سلول‌ها را خارج شد و مقدار ۸۰ میکرولیتر؛ دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد؛ در نهایت پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفتومتر "EPOCH" منتقل شد و میزان جذب نوری نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. درصد سلول‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\times 100 \text{ میانگین جذب نمونه کنترل} / \text{میانگین جذب نمونه تیمار} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

آزمون MTT برای بررسی اثر کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول

برای این آزمون نیز، بعد از کشت سلول‌های رده AGS، سلول‌ها برای بررسی اثر هم‌افزایی عصاره *A. absinthium* و تاکسول، به صورت هم‌زمان با غلظت‌های ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت‌های ۲/۵۰، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول تیمار شدند و بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار میزان بقای سلول‌ها با روش MTT بررسی شد.

بعد از مشخص شدن نتایج حاصل از آزمون MTT تنها از غلظت‌های "IC₅₀" گروه‌های تیماری؛ یعنی غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول و غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول؛ در سایر روش‌های آزمایشگاهی استفاده شد.

رنگ آمیزی هسته ای DAPI: برای رنگ آمیزی هسته سلول‌ها، بررسی آپوپتوز، بررسی میزان تراکم و یا قطعه قطعه شدن کروماتین در هسته سلول‌های تیمار شده و مقایسه آن با گروه کنترل از روش رنگ آمیزی DAPI

دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد؛ برای تهیه عصاره متانولی *A. absinthium* ابتدا اندام‌های هوایی گیاه خشک و سپس پودر شد، سپس به ازای هر یک گرم از پودر گیاه؛ ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد؛ در طی این مدت مخلوط روزی ۳ بار به خوبی هم زده شد؛ پس از گذشت ۷۲ ساعت مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ واتمن صاف شد و در نهایت عصاره گیری توسط دستگاه "Rotary Evaporator" انجام شد؛ برای تهیه استوک اصلی جهت تیمار سلول‌ها، ۰/۰۰۱ گرم از عصاره *A. absinthium* وزن شد و در ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) "CARLO ERBA; France" حل شد، سپس با محیط کشت به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد؛ جهت ساخت غلظت‌های تیماری از استوک اصلی از فرمول N1V1=N2V2 استفاده شد.

تهیه محیط تیماری تاکسول: جهت ساخت غلظت‌های تیماری از استوک اصلی تاکسول "Neshat Darou; Iran" از فرمول N1V1=N2V2 استفاده شد.

آزمون MTT جهت تعیین سمیت سلولی: به منظور بررسی تأثیر عصاره متانولی *A. absinthium* و تاکسول بر روی تکثیر سلول‌های AGS از آزمون MTT استفاده شد؛ برای این کار ابتدا تعداد 4×10^3 عدد از سلول‌ها؛ بعد از شمارش توسط روش رنگ آمیزی تریپان بلو "BIO-IDEA; Iran"؛ در یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها؛ سلول‌های AGS با دی‌متیل سولفوکسید "DMSO" (حلال عصاره *A. absinthium*) به عنوان گروه شاهد آزمایشگاهی (sham) و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* و غلظت‌های ۲/۵۰، ۵، ۱۰، ۱۲/۵۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول تیمار شدند؛ بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول

در تاریکی انکوبه شدند و سپس نمونه‌های به دست آمده با دستگاه فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تست مهاجرت سلولی: این آزمون برای ارزیابی اثر ضد متاستازی غلظت‌های مؤثر گروه‌های تیماری انجام شد؛ برای بررسی میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی رده AGS در گروه‌های تیماری تعداد 4×10^5 عدد از سلول‌های AGS در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد؛ توسط نوک پینیت خراشی (به صورت خط عمودی در راستای قطر پلیت) در کف هر چاهک پلیت ایجاد شد و پس از آن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند؛ پس از گذشت این زمان تحرک، مهاجرت سلول‌ها و همچنین میزان پر شدن خراش در گروه‌های تیماری با گروه کنترل به صورت کیفی در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت توسط و عکس برداری (از لحظه صفر) قبل از تیمار سلول‌ها) و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها) انجام شد.

تکنیک Real-time PCR: مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت "Pars tous" صورت گرفت و برای اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج شده، میزان غلظت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر "EPOCH" سنجیده شد؛ در ادامه سنتز cDNA طبق پروتکل کیت "Pars tous" صورت گرفت و در نهایت تغییرات در میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "9 - Caspase 3 - Caspase 9 - p53" و متاستازی "MMP-2 - MMP-9" در سلول‌های AGS؛ در گروه‌های تیماری؛ توسط دستگاه "Bio-Rad CFX96 RT-PCRs" و نرم افزار "Bio-Rad CFX Manager" بررسی شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real-time PCR به شرح زیر است:

"Sigma-Aldrich; USA" استفاده شد؛ برای این کار، در ابتدا یک کاور اسلیپ استریل در کف هر چاهک پلیت ۶ خانه قرار داده شد، سپس تعداد 4×10^5 عدد از سلول‌های AGS بر روی کاور اسلیپ‌ها کشت داده شدند؛ بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلولی و چسبیدن سلول‌ها به کاور اسلیپ‌ها به آرامی از گوشه هر چاهک پلیت؛ محیط کشت کامل برای گروه کنترل و محیط‌های تیماری برای گروه‌های تیماری اضافه شد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ محیط رویی تمامی گروه‌ها برداشته شد و مقدار یک میلی لیتر متانول، به عنوان فیکساتور سلولی به پلیت اضافه شد و در نهایت سلول‌ها تحت اثر رنگ DAPI قرار گرفتند و تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

آزمون Annexin V-FITC: از این آزمون به منظور تعیین مرگ سلولی استفاده شد؛ جهت انجام این آزمون از کیت "Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kit (ab14085); Abcam; UK" استفاده شد به این صورت که ابتدا تعداد 4×10^5 عدد از سلول‌های AGS در پلیت ۶ خانه کشت شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها؛ سلول‌ها با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*، غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول و غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تاکسول تیمار شدند، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ سلول‌ها توسط تریپسین "BIO-IDEA; Iran" از کف پلیت جدا و به درون میکروتیوپ ۲ میلی لیتری منتقل شدند و سپس سانتریفوژ انجام شد، با خارج کردن محیط رویی، طبق پروتکل کیت به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه شد و سپس ۵ میکرولیتر آزمون Annexin V-FITC و ۵ میکرولیتر پروپیدوم یداید به هر نمونه اضافه شد؛ در نهایت نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Rael-time PCR

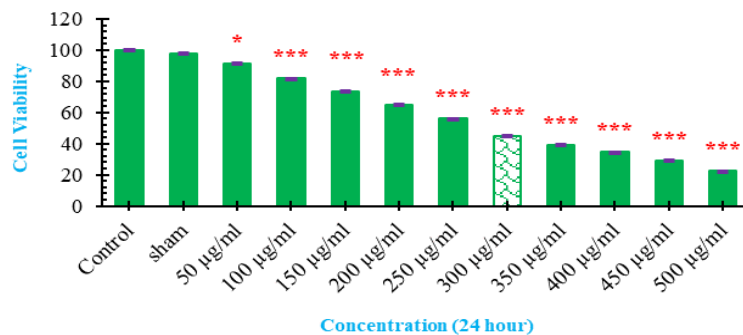
Gene	Sens	Antisense
GAPDH	TGA CTT CAA CAG CGA CAC C	TTG CTG TAG CCA AAT TCG TT
Caspase 3	AGA CAG ACA GTG GTG TTG ATG	GTT CAT CCA GTC GCT TTG TGC
Caspase 9	CCA GAG ATT CGC AAA CCA GAG	CAA TGT GAA CTT CTG CCG TGA
p53	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GA	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG
MMP-2	CAT CGC TCA GAT CCG TGG TGA GA	TCC TCC TGT GGG GCC TCG TAT
MMP-9	CGC ACG ACG TCT TCC AGT ACC GA	ACT GCA GGA TGT CAT AGG TCA CGT AG

غلظت عصاره *A. absinthium* و تاکسول درصد زیست‌پذیری سلول‌ها کاهش می‌یابد؛ همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که، استفاده توأم از عصاره *A. absinthium* و تاکسول اثر بیشتری بر روند کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی رده AGS نسبت به زمانی که از هر کدام به تنهایی استفاده کردیم؛ دارد. با تعیین غلظت مهارتی IC_{50} مشخص شد که این میزان برای عصاره *A. absinthium* غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای تاکسول غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول برای کاربرد توأم؛ در زمان ۲۴ ساعت می‌باشد.

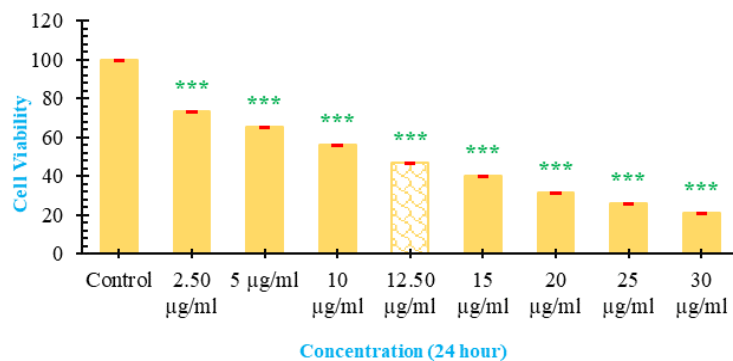
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های آماری حاصل از این مطالعه، در نرم‌افزار "SPSS (Version 26)" و به کمک آزمون آماری واریانس یک طرفه "ANOVA" در سطح معنی‌داری " $p < 0.05$ " تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شده‌اند. برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی؛ تمام آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شد.

نتایج

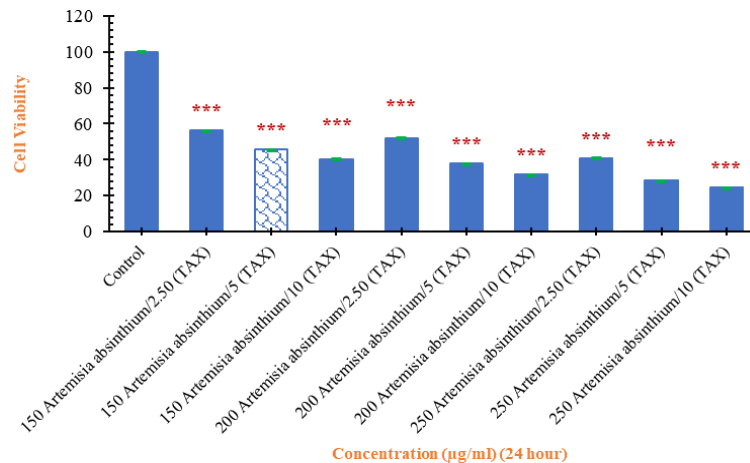
آزمون MTT: نتایج آزمون MTT نشان داد که میزان زنده بودن سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت در گروه‌های تیماری کاهش می‌یابد، به این صورت که با افزایش



نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه‌های تحت تیمار با عصاره *A. absinthium* در مقایسه با نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت ($p < 0.05^*$) ($p < 0.001^{***}$)



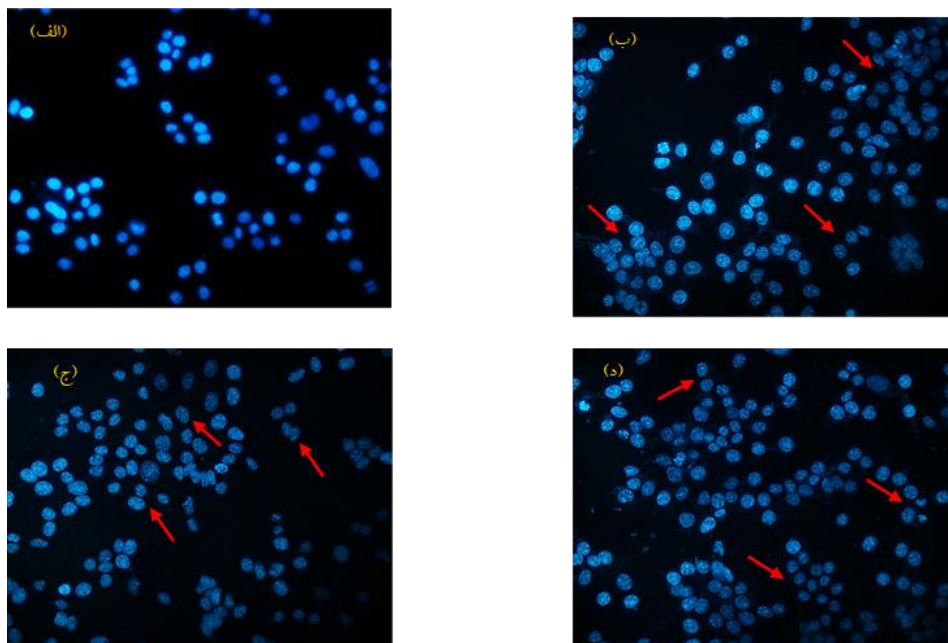
نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه‌های تحت تیمار با تاکسول در مقایسه با نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت ($p < 0.001^{***}$)



نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه های تحت تیمار توأم عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول در مقایسه با نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت ($p < 0.001$ (***)).

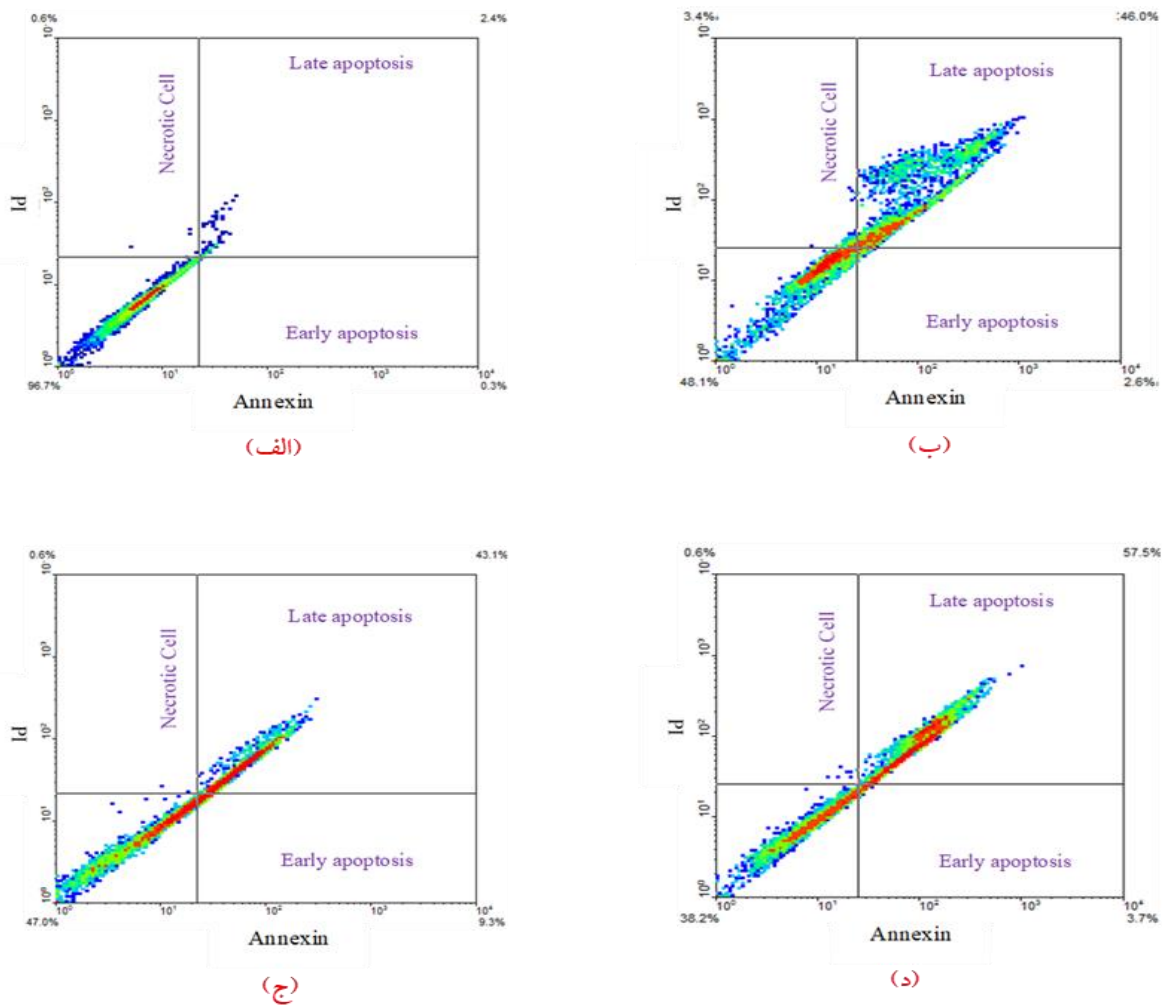
مورفولوژیکی دیده می شود، در گروه های تیماری هسته ها قطعه قطعه شده اند و شکل هسته ها از حالت نرمال خارج شده؛ که می تواند نشانه ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول ها باشد، همان طور که در شکل یک مشاهده می شود. بیشترین آسیب سلولی و تغییرات مورفولوژیک در هسته ها زمانی اتفاق افتاده است که سلول ها با ترکیبی از عصاره *A. absinthium* و تاکسول تیمار شده اند.

رنگ آمیزی DAPI: همان طور که در شکل شماره یک مشاهده می شود، نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI نشان می دهد که در هسته سلول های AGS که تحت تیمار با غلظت های "IC₅₀" از عصاره *A. absinthium* و تاکسول و نیز ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول؛ در زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند؛ نسبت به هسته سلول های گروه کنترل که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده اند، تغییرات



شکل ۱- مشاهده هسته سلول ها توسط رنگ آمیزی DAPI بعد از گذشت ۲۴ ساعت. (الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (ج) تیمار با غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول؛ (د) تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تاکسول (نوک پیکان ها نشان دهنده سلول هایی می باشد که دچار آپوپتوز شده اند). درشت نمایی تصاویر: 400X

تست Annexin V-FITC: برای انجام این تست، سلول‌های AGS با غلظت‌های "IC₅₀"؛ در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند؛ همان‌طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود؛ نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان می‌دهد، درحالی‌که در گروه کنترل حدود ۹۶ درصد از سلول‌های AGS زنده می‌باشند، در گروه تیمار شده با عصاره *A. absinthium* در حدود ۴۶ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند؛ همچنین در گروه تیماری تاکسول درصد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده‌اند در حدود ۴۳/۱ درصد می‌باشد و در گروه تیماری توأم عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول شاهد بیشترین مرگ سلولی به صورت آپوپتوز ثانویه هستیم، به طوری‌که در این گروه، در ۵/۷۷ درصد از سلول‌های سرطانی AGS آپوپتوز ثانویه رخ داده است.



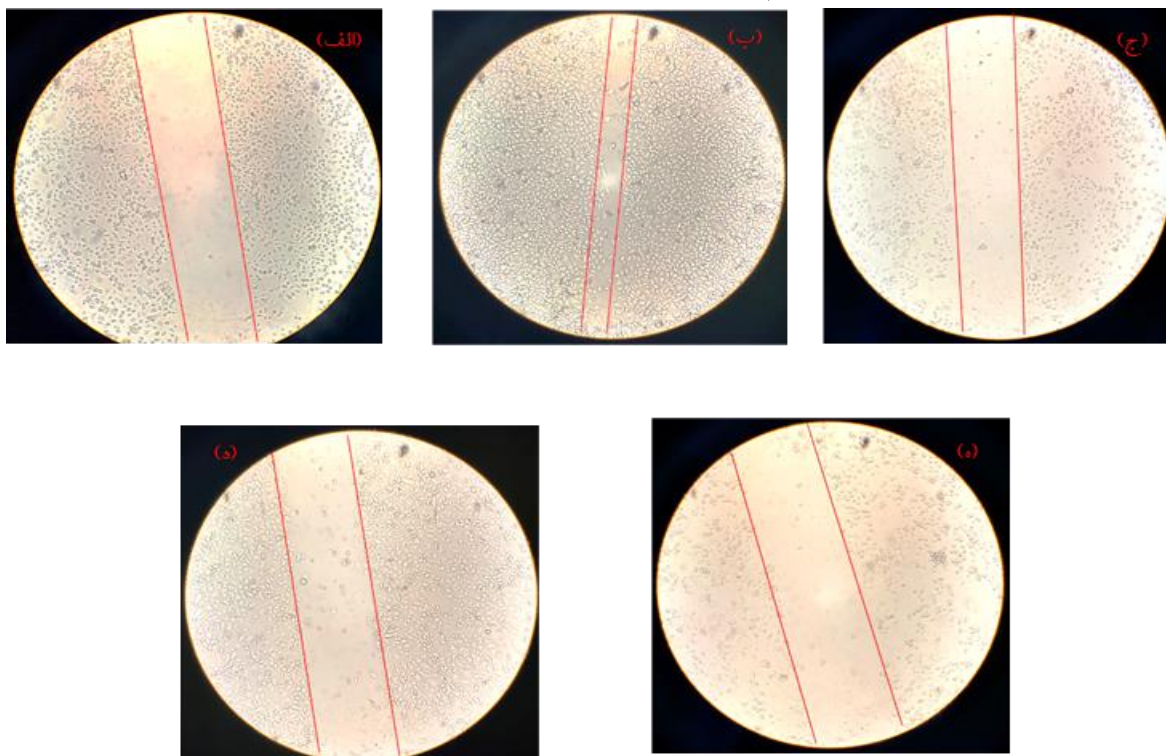
شکل ۲ - آنالیز فلوسایتومتری. (الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *A. absinthium*؛ (ج) تیمار با غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تاکسول؛ (د) تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاکسول

نسبت به گروه‌های تیماری می‌باشند؛ بررسی‌های کیفی توسط عکس برداری نشان داد که تحرک سلول‌های سرطانی AGS در تمام گروه‌های تیماری در زمان ۲۴

تست مهاجرت سلولی: نتایج حاصل از این تست نشان داد که سلول‌های گروه کنترل دارای قدرت مهاجرت بیشتر و تهاجم سریع‌تری برای پر کردن ناحیه خراش

قدرت تحرک و تهاجم سلول‌ها برای پر کردن ناحیه خراش به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرده بود.

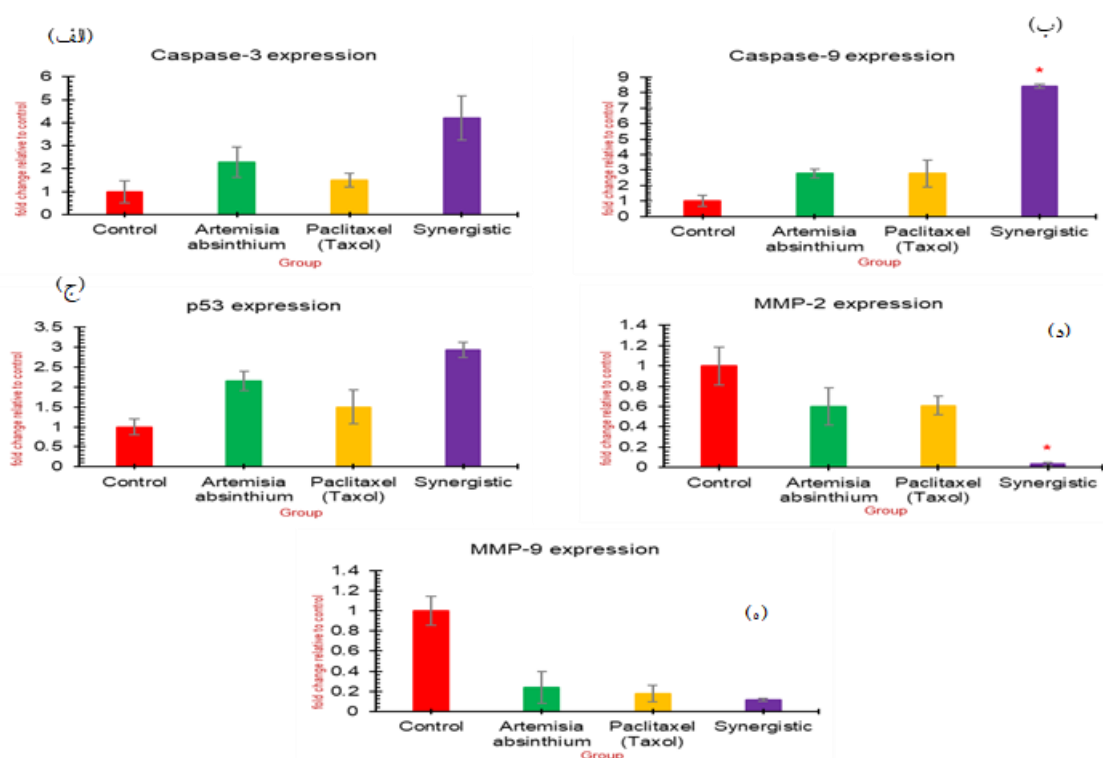
ساعت کاهش پیدا کرده بود؛ در گروه تیماری کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به همراه تاکسول با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر،



شکل ۳- بررسی روند مهاجرت سلول‌ها. (الف) سلول‌های AGS در لحظه ایجاد خراش (ساعت صفر)؛ (ب) سلول‌های گروه کنترل؛ (ج) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (د) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول؛ (د) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول. (پس از گذشت ۲۴ ساعت از ایجاد خراش) درشت‌نمایی تصاویر: 100X

"MMP-2 - MMP-9" در گروه تیمار شده با ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول دیده شده است؛ که این امر نشان دهنده توانایی این ترکیب در کاهش بیان ژن‌های متاستازی در سلول‌های سرطانی AGS می‌باشد؛ ژن‌های "MMP-2 - MMP-9" از مهمترین ماتریکس متالوپروتئینازهایی (MMPهایی) هستند که در فرآیند مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی دخالت دارند و کاهش بیان این ژن‌ها باعث مهار توانایی مهاجرت سلول‌های سرطانی و همچنین جلوگیری از متاستاز به بافت‌های دورتر می‌شود.

بررسی بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real-time PCR: همان‌طور که در شکل شماره ۴ مشاهده می‌شود، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" در تمام گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است؛ که این امر نشان دهنده القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده انسانی رده AGS نسبت به گروه کنترل می‌باشد؛ همچنین نتایج حاصل از تکنیک Real-time PCR نشان دهنده کاهش در میزان بیان ژن‌های متاستازی "MMP-2 - MMP-9" در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل بود. بیشترین افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" و همچنین بیشترین کاهش بیان ژن‌های متاستازی



شکل ۴- بررسی میزان تغییرات در بیان ژن‌های آپوپتوزی و ژن‌های متاستازی توسط تکنیک Real-time PCR ($p < 0.05$). بیان ژن (الف) بیان ژن Caspase-3؛ (ب) بیان ژن Caspase-9؛ (ج) بیان ژن p53؛ (د) بیان ژن MMP-2؛ (ه) بیان ژن MMP-9

بحث و نتیجه‌گیری

آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" و ژن‌های متاستازی "MMP-2 - MMP-9" با تکنیک Real-time PCR بررسی شد.

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره *A. absinthium* و تاکسول می‌توانند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی رده AGS شوند. بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که از کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول جهت تیمار سلول‌ها استفاده شد؛ به این صورت که در این محیط تیماری تکثیر سلول‌ها به طور قابل توجهی و در سطح معنی‌داری ($p < 0.001$ ***) مهار شد. این نتایج بیان‌گر این است که ترکیب عصاره *A. absinthium* با تاکسول اثر بیشتری بر مهار تکثیر سلول‌ها دارد؛ که این امر با توجه به کاهش میزان غلظت "IC₅₀" نسبت به زمانی که از عصاره *A. absinthium* و تاکسول به تنهایی استفاده کردیم، قابل اثبات است.

با توجه به شواهدی مبنی بر خاصیت ضد سرطانی گیاهان جنس *Artemisia*؛ در این پژوهش تجربی برای اولین بار اثر هم‌افزایی عصاره متانولی *A. absinthium* و تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی معده انسانی (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی "Caspase - p53" و "Caspase 9 - 3" و متاستازی "MMP-2 - MMP-9" بررسی شد؛ جهت انجام این پژوهش بعد از تهیه عصاره متانولی *A. absinthium*؛ برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره *A. absinthium* و تاکسول و نیز کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* با تاکسول بر روی تکثیر سلول‌ها از آزمون MTT استفاده شد؛ برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار از رنگ آمیزی DAPI و آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد؛ همچنین برای ارزیابی اثر ضد متاستازی گروه‌های تیماری از تست مهاجرت سلولی استفاده شد و در نهایت تغییرات در میزان بیان ژن‌های

عصاره *A. absinthium* با تاکسول، به ترتیب به ۴۸، ۴۷ و ۳۸ درصد کاهش داشته است؛ در نتیجه می‌توان بیان کرد که ترکیب عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول توانایی خوبی برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده انسانی رده AGS دارد.

در سال ۲۰۱۷ Kim و همکاران توانایی القای آپوپتوز عصاره *Artemisia annua* را در رده سلولی HCT116 (سرطان کولون) بررسی کردند و با استفاده از آزمون Annexin V-FITC نشان دادند که در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره *A. annua* درصد سلول‌های آپپتوتیک افزایش می‌یابد و همچنین تیمار با عصاره *A. annua* می‌تواند بیان ژن آنتی آپپتیک Bcl-2 را کاهش و بیان ژن آپپتوزی BAX را افزایش دهد و در نهایت نتیجه گرفتند که عصاره *A. annua* دارای توانایی القای آپپتوز در رده سلولی HCT116 می‌باشد (۸)؛ تمامی نتایج تجربیات آزمایشگاهی حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در القای آپپتوز در رده سلولی AGS بود.

نتایج Real-time PCR نشان داد که استفاده از ترکیب عصاره *A. absinthium* و تاکسول به صورت هم‌زمان می‌تواند باعث افزایش سطح بیان ژن‌های آپپتوزی "p53 - Caspase 3 - Caspase 9" و کاهش بیان ژن‌های متاستازی "MMP-2 - MMP-9" در سلول‌های سرطانی رده AGS (در سطح معنی‌داری *p<0.05) تحت تیمار شود؛ با توجه به نتایج حاصل از Real-time PCR می‌توان بیان کرد که ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول توانایی قابل توجهی در بالا بردن سطح بیان ژن‌های آپپتوزی و همچنین کاهش بیان ژن‌های متاستازی دارد و در آینده می‌تواند با مطالعات و تحقیقات کامل‌تر؛ بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

Tayarani-najaran و همکاران در سال ۲۰۱۶؛ به بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپپتوتیک عصاره دی‌کلرومتانی

در سال ۲۰۱۴؛ Gordanian و همکاران به بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره پنج‌گونه مختلف *Artemisia* (از جمله *A. absinthium*) در برابر رده سرطانی MCF-7 پرداختند؛ نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره پنج‌گونه مختلف *Artemisia* به صورت وابسته به غلظت باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی سینه می‌شوند، همچنین نشان دادند که فعالیت سیتوتوکسیک گونه‌های *A. absinthium* و *A. vulgaris* از سایر گونه‌های دیگر بیشتر است (۷)؛ نتایج حاصل از آزمون MTT اجرا شده در این پژوهش نیز نشان دهنده اثرات مهاری عصاره *A. absinthium* به صورت وابسته به غلظت بر روند تکثیر سلول‌های سرطانی رده AGS بود. در سال ۲۰۱۸ Kim و همکاران؛ اثرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری عصاره اتانولی برگ‌های گیاه *Artemisia capillaris* در برابر رده‌های سلولی سرطانی Huh7 و HepG2 را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره *A. capillaris* تکثیر این سلول‌ها را به شدت سرکوب می‌کند و با افزایش سطح بیان کاسپاز-۳ باعث القای آپپتوز در سلول‌های Huh7 و HepG2 می‌شود (۹)؛ که با تمامی نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو می‌باشد.

بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته‌ها با رنگ آمیزی DAPI نشان داد که در گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی دیده می‌شود؛ همان‌طور که در شکل شماره یک هم مشخص می‌باشد در گروه‌های تیماری هسته‌ها قطعه‌قطعه شده‌اند و از حالت نرمال خارج شده‌اند، که این امر می‌تواند نشانه‌ای برای وقوع آپپتوز در این سلول‌ها می‌باشد؛ بیشترین آسیب سلولی و تغییرات در هسته‌ها زمانی اتفاق افتاده است که سلول‌ها با ترکیبی از عصاره *A. absinthium* و تاکسول تیمار شده‌اند. همچنین نتایج تست Annexin V-FITC نشان داد، در حالی که درصد زنده بودن سلول‌های گروه کنترل در حدود ۹۶ درصد می‌باشد؛ این میزان در سلول‌های تیمار شده با عصاره *A. absinthium*، تاکسول و ترکیب توأم

نموده و باعث القای آپوپتوز و کاهش قدرت تهاجم در این سلول‌ها می‌شود؛ لذا این ترکیب در آینده می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان معده؛ مورد توجه و مطالعه بیشتری قرار گیرد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از کلیه اساتید و کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این طرح همکاری داشتند تشکر می‌شود.

Artemisia biennis در برابر رده‌های سلولی K562 و HL-60 پرداختند و نشان دادند که عصاره *A. biennis* باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود و با افزایش سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX باعث القای آپوپتوز در سلول‌های K562 و HL-60 می‌شود (۲۰)؛ که با نتایج پژوهش حاضر که نشان دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در بالابردن سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی هم‌راستا می‌باشد.

یافته‌های حاصل از این پژوهش تجربی نشان داد که کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول تکثیر سلول‌های سرطانی معده رده AGS را به طور قابل توجهی مهار

منابع

- Chakravarthi, B.V.S.K., Sujay, R., Kuriakose, G.C., Karande, A.A. and Jayabaskaran, C., 2013. Inhibition of cancer cell proliferation and apoptosis-inducing activity of fungal taxol and its precursor baccatin III purified from endophytic *Fusarium solani*. *Cancer Cell International*, 13, PP.1–11.
- Choi, E. and Kim, G., 2013. Effect of *Artemisia* species on cellular proliferation and apoptosis in human breast cancer cells via estrogen receptor-related pathway. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33, PP.658–663.
- Elsayed, E.A., Sharaf-Eldin, M.A. and Wadaan, M., 2015. In vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, PP.4671–4675.
- Farhood, B., Geraily, G. and Alizadeh, A., 2018. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: A review article. *Iranian Journal of Public Health*, 47, PP.309–316.
- Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T.F., Al Lami, F.H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., et al., 2018. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*, 4, PP.1553–1568.
- Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M. and Baradaran, B., 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, PP.2129–2144.
- Gordanian, B., Behbahani, M., Carapetian, J. and Fazilati, M., 2014. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9, PP.91–96.
- Kim, E.J., Kim, G.T., Kim, B.M., Lim, E.G., Kim, S.Y. and Kim, Y.M., 2017. Apoptosis-induced effects of extract from *Artemisia annua* Linné by modulating PTEN/p53/PDK1/Akt/signal pathways through PTEN/p53-independent manner in HCT116 colon cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, PP.1–12.
- Kim, J., Jung, K.H., Yan, H.H., Cheon, M.J., Kang, S., Jin, X., et al., 2018. *Artemisia Capillaris* leaves inhibit cell proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, PP.1–10.
- Kooti, W., Servatyari, K., Behzadifar, M., Asadi-Samani, M., Sadeghi, F., Nouri, B., et al., 2017. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22, PP.982–995.
- Lian, G., Li, F., Yin, Y., Chen, L. and Yang, J., 2018. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15

- human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *Journal of B.U.ON.*, 23, PP.73–78.
- 12- Liu, T., Liu, X. and Li, W., 2016. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. *Oncotarget*, 7, PP.40800–40815.
- 13- Martínez-Díaz, R.A., Ibáñez-Escribano, A., Burillo, J., de las Heras, L., del Prado, G., Agulló-Ortuño, M.T., et al., 2015. Trypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, PP.693–699.
- 14- Mei, M., Xie, D., Zhang, Y., Jin, J., You, F., Li, Y., et al., 2014. A new $2\alpha,5\alpha,10\beta,14\beta$ -tetraacetoxy-4(20),11-taxadiene (SIA) derivative overcomes paclitaxel resistance by inhibiting MAPK signaling and increasing paclitaxel accumulation in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 9, PP.1–13.
- 15- Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.Y., Lin, L.T., et al., 2015. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, PP.78–103.
- 16- Nagini, S., 2012. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4, PP.156–169
- 17- Shafi, G., Hasan, T.N., Syed, N.A., Al-Hazzani, A.A., Alshatwi, A.A., Jyothi, A., et al., 2012. *Artemisia absinthium* (AA): A novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Molecular Biology Reports*, 39, PP.7373–7379.
- 18- Suhail, Y., Cain, M.P., Vanaja, K., Kurywchak, P.A., Levchenko, A., Kalluri, R., et al., 2019. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9, PP.109–127.
- 19- Taleghani, A., Emami, S.A. and Tayarani-Najaran, Z., 2020. *Artemisia*: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 28, PP.1-22.
- 20- Tayarani-Najaran, Z., Makki, F.S., Alamolhodaei, N.S., Mojarrab, M. and Emami, S.A., 2017. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia biennis* Willd. on K562 and HL-60 cell lines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20, PP.166–171.

The synergistic effect of *Artemisia absinthium* extract and Taxol on gastric cancer cells (AGS cell line) and changes in expression level of apoptotic and metastatic genes

Foroughi F.¹, Baharara J.^{1,2*} and Nejad Shahrokh Abadi Kh.¹

¹ Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. of Iran

² Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Gastric cancer is the second leading cause of cancer death worldwide. *Artemisia absinthium* is one of the genus *Artemisia* which has anti-inflammatory and anti-viral properties. In the present study investigated the ability of methanolic extract of *A. absinthium* alone and in combination with Taxol to induce apoptosis and inhibited cell migration in the AGS cell line. Investigating cytotoxic effect of combined *A. absinthium* extract with Taxol on the proliferation of AGS cells, were used MTT assay; DAPI staining and flow cytometry analysis were used to evaluate the ability to induce apoptosis in treated cells and cell migration test was used to evaluate the anti-invasive effect; Changes in the expression of apoptotic "p53-Caspase-3,9" and metastasis genes "MMP-2,9" were examined by real-time PCR. The MTT results showed that the combination of *A. absinthium* extract with Taxol inhibited the proliferation of AGS cells in a concentration-dependent manner, Morphological observations obtained from DAPI and results of flow cytometry showed an increase in the percentage of apoptotic cells in the treatment groups. The results of cell migration test showed a decrease in the invasive potential of AGS cells. The real-time PCR results showed an increase in the expression of apoptotic genes and a decrease in the expression of metastatic genes in the treatment groups " $p < 0.05$ ". The results of this study showed that the combined use of *A. absinthium* extract with Taxol inhibits the proliferation of AGS cells and induces apoptosis and inhibits the ability to migrate.

Key words: Gastric cancer, *Artemisia absinthium*, Taxol, Apoptosis, Metastasis