DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

بررسی اثر هم افزایی عصاره *Artemisia absinthium* و Taxol روی سلول های سرطانی معده (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن های آپوپتوزی و متاستازی

فیروزه فروغی[۱]، جواد بهارآرا [۲،۱*] و خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۱]

[۱] ایران، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی

[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 علّت 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 فلوسایتومری 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

مسیرهای سلولی و مولکولی در انواع مختلف سرطان ها متفاوت هستند، امّا همه انواع سرطان دارای ویژگی های مشابه می باشند، که به عنوان نشانه های اصلی سرطان شناخته می شوند؛ سلول های سرطانی توانایی متاستاز، آنژیوژنز (رگ زایی)، تهاجم و حمله به سلول ها و بافت های مجاور را دارند؛ این سلول ها سیگنال های رشد را به صورت خود مختار تولید می کنند و به آن ها پاسخ می دهند و از طرفی به سیگنال های مهاری و آپوپتوتیک رسیده به سلول سرطانی پاسخ نمی دهند؛ این عملکرد در سلول های سرطانی منجر به رشد نا محدود و تکثیر بی رویه سلول ها می شود (۱۲). این ویژگی های منحصر به فرد سلول های سرطانی باعث پخش شدن سلول ها در

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

سراسر بدن و آسیب رساندن به بافت ها و دشوارتر شدن روند درمان می شوند (۱۲). بعد از بیماری های قلبی-عروقی، سرطان دومین علّت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است و در ایران نیز سومین عامل مرگ و میر به حساب می آید (۴ و ۵)؛ همچنین تخمین زده می شود در سال ۲۰۳۵ تعداد موارد گزارش ابتلا به سرطان، در حدود ۷۰درصد افزایش داشته باشد (۳).

در شرایط پاتولوژیک، به ویژه سرطان، سلول ها توانایی خود را برای مرگ ناشی از آپوپتوز از دست می دهند که این امر منجر به تکثیر بی رویه سلول های سرطانی می شود؛ سلول های سرطانی غالباً دارای بیان بیش از حد بسیاری از پروتئین هایی هستند که نقش مهمی در مقاومت در برابر فعال شدن آبشار آپوپتوتیک دارند، مکانیسم های مختلف باعث می شود سلول ها از مرگ برنامه ریزی شده سلولی فرار کنند و در مقابل مولکول های ضد آپوپتوزی را بیش از حد بیان کنند (۱۸). در نتیجه امروزه بسیاری از استراتژی های درمانی بر اساس راه اندازی مجدد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در سلول های سرطانی استوار است (۶).

متاستاز فرآیندی است که در طی آن سلول های سرطانی از تومور اولیه منتشر شده و در محل دیگری غیر از محل تومور اولیه رشد می کنند؛ جابه جایی سلول های سرطانی به قسمت های دیگر بدن (متاستاز)، دلیل اصلی مرگ و میرهای ناشی از سرطان (حدود ۹۰درصدِ 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؛ جهش های ایجاد شده در سلول های سرطانی می توانند، فعالیت آنزیم های دخیل در تهاجم و مولکول های درگیر در اتصالات سلول به سلول و سلول به ماده زمینه ای خارج سلولی را تغییر دهند، که این امر به سلول های سرطانی این امکان را می دهد که بتوانند از مکان اولیه خود حرکت کرده و به سایر نقاط بدن مهاجرت کنند (۱۸).

سرطان معده یک بیماری با علّت پیچیده است که شامل تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متعدد است؛ در حال حاضر شواهدی وجود دارد که جهش در تعدادی از ژن ها 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 می باشد؛ سرطان معده بیشترین بروز را در مردان و سومین رتبه را در میان زنان پس از سرطان های سینه و کولون (روده بزرگ) دارد (۴). با وجود پیدایش تکنیک های پیشرفته در عمل های جراحی سرطان معده، هنوز هم سرطانی کُشنده و خطرناک به حساب می آید، حدود ۹۰درصد از تومورهای معده بدخیم می باشند؛ همچنین این نوع سرطان مقاومت بالایی نسبت به داروهای شیمی‌درمانی ایجاد می کند، در نتیجه استراتژی‌های درمانی مؤثر واقع نمی‌شوند و نتایج مورد انتظار بالینی حاصل نمی‌شوند (۱۶).

تاکسول از رایج ترین داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی می باشد؛ تاکسول (با نام عمومی پاکلیتاکسل) یک ترکیب دی ترپنی با ساختاری پیچیده می باشد، که فعالیت ضد توموری قابل توجهی دارد؛ تاکسول یک ترکیب ضد سرطانی با منشاء گیاهی می باشد که از پوست درخت سرخدار با نام علمی "*Taxus berevitolia*. L" به دست می آید (۱). تاکسول از دپلیمریزه شدن میکروتوبول ها جلوگیری می کند در نتیجه باعث می شود که تجمعات توبولین به صورت یک ساختار پایدار درآیند که باعث ایجاد ثبات در میکروتوبول ها و ناکارآمدی آن ها می شود، که این امر در نهایت باعث توقف چرخه سلولی در اواخر فاز G2/M و القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی می شود (۱ و ۱۴).

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

گیاهان طیف گسترده ای از ترکیبات شیمیایی را تولید می کنند که به این ترکیبات متابولیت ثانویه گفته می شود؛ آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، رنگدانه ها و تانن ها مهم ترین این ترکیبات هستند؛ این متابولیت های ثانویه دارای اثرات بیولوژیکی متنوعی مانند اثرات ضد التهابی، ضد سرطانی و غیره می باشند؛ اعتقاد بر این است که اثرات ضد سرطانی گیاهان با سرکوب آنزیم های تحریک کننده سرطان، ترمیم DNA، تحریک تولید آنزیم های ضد تومور در سلول، افزایش ایمنی بدن و القای اثرات آنتی اکسیدانی ایجاد می شود (۱۰)؛ از این رو به کارگیری ترکیبات طبیعی همچون گیاهان دارویی به منظور مهار فرآیند تومورزایی و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی؛ امروزه به عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با سرطان است که دارای اثرات جانبی و هزینه کمتری می باشند مطرح شده است (۱۰).

گیاهان جنس *Artemisia* (دِرمنه) متعلق به خانواده Compositae (Asteraceae) (خانواده کاسنی ها) یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی می باشد؛ 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 گونه های مهم این جنس است (۱۳ و ۱۹). گیاهان جنس *Artemisia* و ترکیبات فعال حاصل از آن؛ به عنوان داروهای ضد سرطانی، ضد مالاریا، آنتی اکسیدانی، سیتوتوکسیک، ضد اسپاسم، ضد التهابی، ضد میکروبی و غیره بررسی شده اند؛ تحقیقات نشان داده است که عصاره برخی از گونه های *Artemisia* دارای فعالیت سیتوتوکسیکی و اثر آپوپتوزی در شرایط آزمایشگاهی در برابر رده های سلولی سرطانی و مدل های حیوانی سرطانی می باشد و در مقابل دارای سمیت کم و حتی بی تأثیر در برابر سلول های طبیعی می باشد (۱۳ و ۱۹).

در این راستا؛ Shafi و همکاران در سال ۲۰۱۲؛ به بررسی نقش عصاره *A. absinthium* در مهار تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی سینه؛ دودمان های MDA-MB-231 و MCF-7 پرداختند، نتایج این مطالعات نشان دهنده اثرات ضد تکثیری عصاره *A. absinthium* بر روی سلول های 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 سلول های سرطانی سینه انسانی رده MCF-7 بررسی کردند و نشان دادند که عصاره تمام هشت گونه *Artemisia* باعث کاهش تکثیر سلول های سرطانی می شود (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 سلول های سرطانی می باشد و باعث مهار رشد این سلول ها می شود (۱۱).

هدف از این پژوهش تجربی؛ بررسی اثر هم افزایی عصاره *A. absinthium* و تاکسول بر روی سلول های سرطانی معده انسانی (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن های آپوپتوزی "p53 - Caspase 3 - Caspase 9" و متاستازی "MMP-2 – MMP-9" می باشد.

مواد و روشها

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

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

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد؛ برای تهیه عصاره متانولی *A. absinthium* ابتدا اندام های هوایی گیاه خشک و سپس پودر شد، سپس به ازای هر یک گرم از پودر گیاه؛ ۱۰ میلی لیتر متانول اضافه شد و به مدّت ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد؛ در طی این مدّت 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 سلول ها، ۰/۰۰۱ گرم از عصاره *A. absinthium* وزن شد و در ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) "CARLO ERBA; France" حل شد، سپس با محیط کشت به حجم یک میلی لیتر رسانده شد؛ جهت ساخت غلظت های تیماری از استوک اصلی از فرمول N1V1=N2V2 استفاده شد.

تهیه محیط تیماری تاکسول: جهت ساخت غلظت های 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 سلول های AGS از آزمون MTT استفاده شد؛ برای این کار ابتدا تعداد ۴×۱۰^{۳} عدد از سلول ها؛ 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 سلول ها؛ سلول های AGS با دی متیل سولفوکسید "DMSO" (حلال عصاره *A. absinthium*) به عنوان گروه شاهد آزمایشگاهی (sham) و غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium* و غلظت های ۲/۵۰، ۵، ۱۰، ۱۲/۵۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول تیمار شدند؛ بعد گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT "Sigma-Aldrich; USA" به محیط سلول ها اضافه شد، سپس پلیت کشت سلول ها برای مدّت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد؛ سپس، مایع رویی سلول ها را خارج شد و مقدار ۸۰ میکرولیتر؛ دی متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد؛ در نهایت پلیت مربوطه به دستگاه اسپکتروفتومتر "EPOCH" منتقل شد و میزان جذب نوری نمونه ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. درصد سلول های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× میانگین جذب نمونه کنترل / میانگین جذب نمونه تیمار = درصد سلول های زنده

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

برای این آزمون نیز، بعد از کشت سلول های رده AGS، سلول ها برای بررسی اثر هم افزایی عصاره *A. absinthium* و تاکسول، به صورت هم زمان با غلظت های ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت های ۲/۵۰، ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول تیمار شدند و بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت از تیمار میزان بقای سلول ها با روش MTT بررسی شد.

بعد از مشخص شدن نتایج حاصل از آزمون MTT تنها از غلظت های "IC_{50}" گروه های تیماری؛ یعنی 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 از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول؛ در سایر روش های آزمایشگاهی استفاده شد.

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

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

"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 ۴×۱۰^{۵} عدد از سلول های AGSبر روی کاور اسلیپ ها کشت داده شدند؛ بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلولی و چسبیدن سلول ها به کاور اسلیپ ها به آرامی از گوشه هر چاهکِ پلیت؛ محیط کشت کامل برای گروه کنترل و محیط های تیماری برای گروه های تیماری اضافه شد، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار؛ محیط رویی تمامی گروه ها برداشته شد و مقدار یک میلی لیتر متانول، به عنوان فیکساتور سلولی به پلیت اضافه شد و در نهایت سلول ها تحت اثر رنگ DAPI قرار گرفتند و تغییرات ایجاد شده در مورفولوژی سلول ها 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 ۴×۱۰^{۵} عدد از سلول های AGS در پلیت ۶ خانه کشت شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول ها؛ سلول ها با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*، غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول از 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؛ سلول ها 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 پروپیدیوم یداید به هر نمونه اضافه شد؛ در نهایت نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و سپس نمونه های به دست آمده با دستگاه فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تست مهاجرت سلولی: این آزمون برای ارزیابی اثر ضد متاستازی غلظت های مؤثر گروه های تیماری انجام شد؛ برای بررسی میزان مهاجرت سلول های سرطانی رده AGS در گروه های تیماری تعداد ۴×۱۰^{۵} عدد از سلول های AGSدر پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و پس از رسیدن تراکم سلول ها به حدود ۸۰درصد؛ توسط نوک پیپیت خراشی (به صورت خط عمودی در راستای قطر پلیت) در کف هر چاهک پلیت ایجاد شد و پس از آن سلول ها به مدّت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند؛ پس از گذشت این زمان تحرک، مهاجرت سلول ها و همچنین میزان پر شدن خراش در گروه های 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 سلول ها) و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول ها) 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 ژن های آپوپتوزی "p53 - Caspase 3 - Caspase 9" و متاستازی "MMP-2 – MMP-9" در سلول های AGS؛ در گروه های تیماری؛ توسط دستگاه " Bio-Rad CFX96 RT-PCRs" و نرم افزار "Bio-Rad CFX Manager" بررسی شد.

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

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

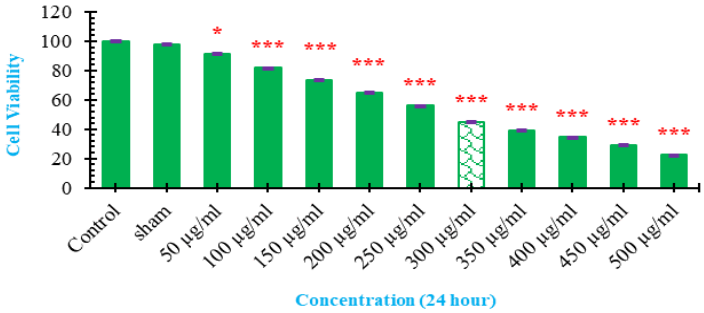
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Rael-time PCR

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

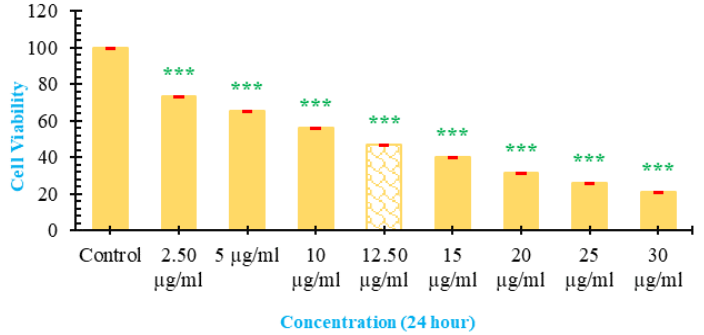
تجزیه و تحلیل آماری: داده های آماری حاصل از این مطالعه، در نرم افزار "SPSS (Version 26)" و به کمک آزمون آماری واریانس یک طرفه "ANOVA" در سطح معنی داری "$p< 0.05$" تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از نرم افزار Excel رسم شده اند. برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش تجربی؛ تمام آزمایشات به صورت سه بار تکرار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

نتایج

آزمون MTT: نتایج آزمون MTT نشان داد که میزان زنده بودن سلول ها به صورت وابسته به غلظت در گروه های تیماری کاهش می یابد، به این صورت که با افزایش غلظت عصاره *A. absinthium* و تاکسول درصد زیست پذیری سلول ها کاهش می یابد؛ همچنین نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که، استفاده توأم از عصاره *A. absinthium* و تاکسول اثر بیشتری بر روند کاهش تکثیر سلول های سرطانی رده AGS نسبت به زمانی که از هر کدام به تنهایی استفاده کردیم؛ دارد. با تعیین غلظت مهاری "IC_{50}" مشخص شد که این میزان برای عصاره *A. absinthium* غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، برای تاکسول غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول برای کاربرد توأم؛ در زمان در ۲۴ ساعت می باشد.

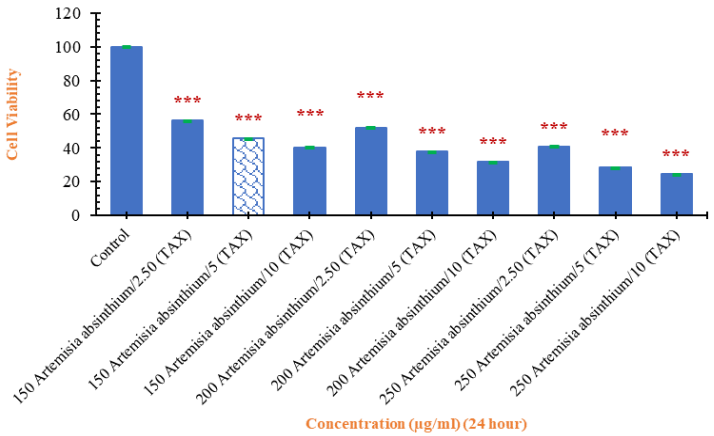


نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه های تحت تیمار با عصاره *A. absinthium* در مقایسه با نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت ($p<۰/۰۵^{*}$) ($p<۰/۰۰۱^{***}$)



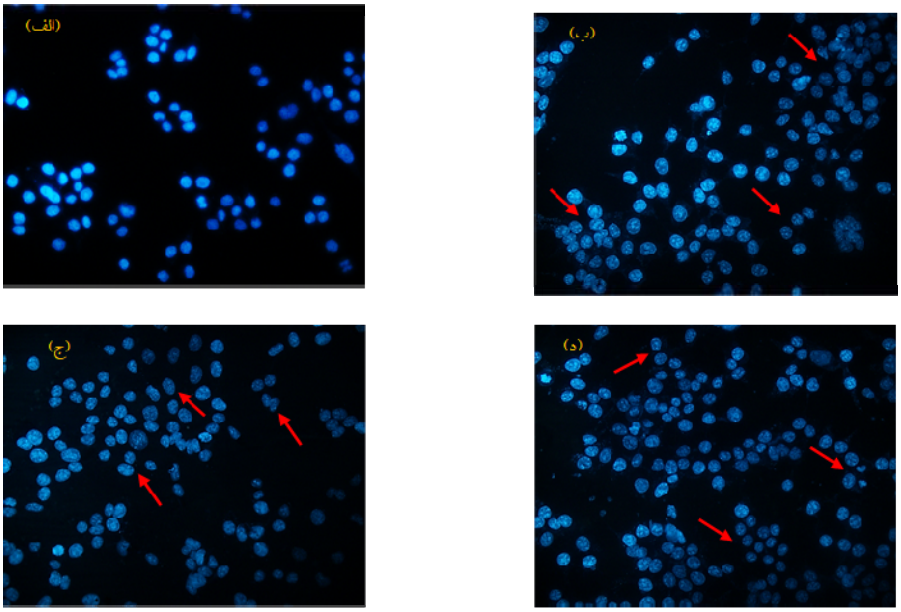
نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد زنده ماندن نمونه های تحت تیمار با تاکسول در مقایسه با نمونه کنترل در زمان ۲۴ ساعت ($p<۰/۰۰۱^{***}$)

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9



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 ($p<۰/۰۰۱^{***}$)

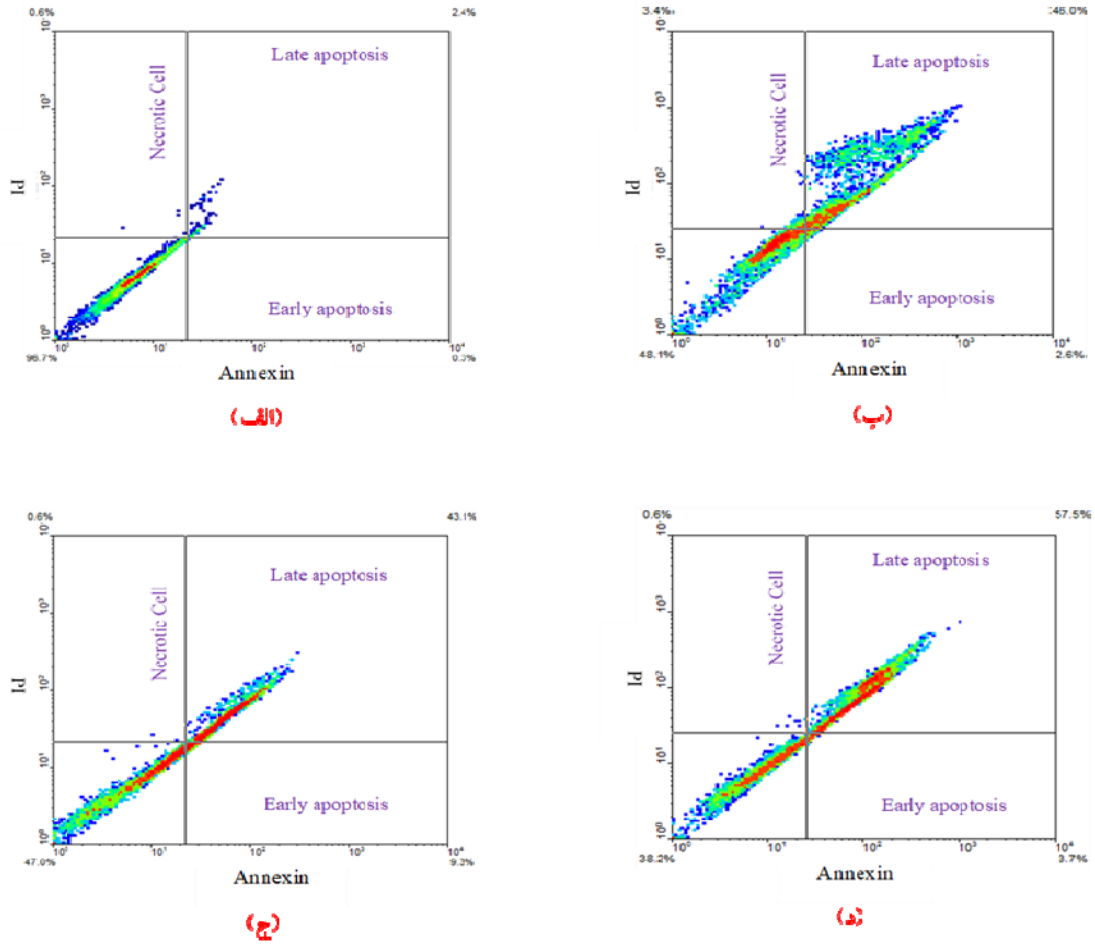
رنگ آمیزی DAPI: همان طور که در شکل شماره یک مشاهده می شود، نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI نشان می دهد که در هسته سلول های AGS که تحت تیمار با غلظت های "IC_{50}" از عصاره *A. absinthium* و تاکسول و نیز ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول؛ در زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند؛ نسبت به هسته سلول های گروه کنترل که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده اند، تغییرات 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.



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

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

تست Annexin V-FITC: برای انجام این تست، سلول های AGS؛ با غلظت های "IC_{50}"؛ در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند؛ همان طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می شود؛ نتایج آزمون Annexin V-FITC نشان می دهد، درحالی که در گروه کنترل حدود ۹۶درصد از سلول های AGS زنده می باشند، در گروه تیمار شده با عصاره *A. absinthium* در حدود ۴۶درصد سلول ها دچار آپوپتوز ثانویه شده اند؛ همچنین در گروه تیماری تاکسول درصد سلول هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده اند در حدود ۴۳/۱درصد می باشد و در گروه تیماری توأم عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول شاهد بیشترین مرگ سلولی به صورت آپوپتوز ثانویه هستیم، به طوری که در این گروه، در ۵۷/۵درصد از سلول های سرطانی AGS آپوپتوز ثانویه رخ داده است.

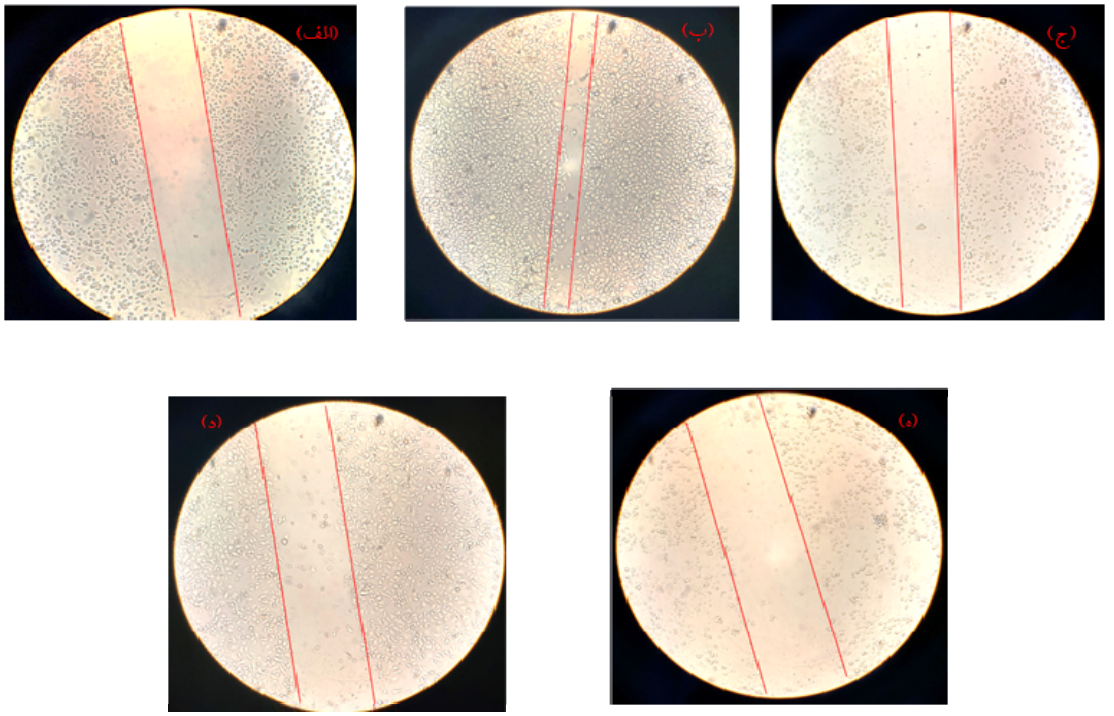


شکل ۲ – آنالیز فلوسایتومتری. (الف) گروه کنترل؛ (ب) تیمار با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (ج) تیمار با غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول؛ (د) تیمار با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره *A. absinthium* به همراه غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تاکسول

تست مهاجرت سلولی: نتایج حاصل از این تست نشان داد که سلول های گروه کنترل دارای قدرت مهاجرت بیشتر و تهاجم سریع تری برای پر کردن ناحیه خراش نسبت به گروه های تیماری می باشند؛ بررسی های کیفی توسط عکس برداری نشان داد که تحرک سلول های سرطانی AGS در تمام گروه های تیماری در زمان ۲۴

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

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

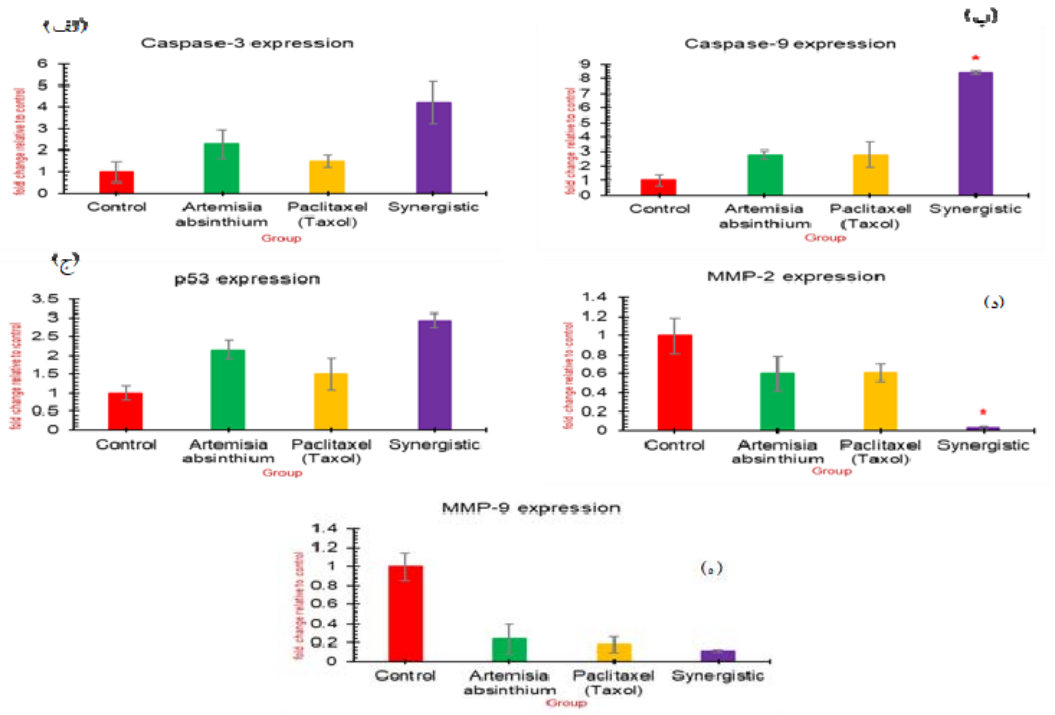


شکل ۳- بررسی روند مهاجرت سلول ها. (الف) سلول های AGS در لحظه ایجاد خراش (ساعت صفر)؛ (ب) سلول های گروه کنترل؛ (ج) سلول های تیمار شده با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره *A. absinthium*؛ (د) سلول های تیمار شده با غلظت ۱۲/۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از تاکسول؛ (د) سلول های تیمار شده با غلظت ۱۵۰ میکروگرم 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) درشت نمایی تصاویر: 100X

بررسی بیان ژن ها توسط تکنیک Real-time PCR:

همان طور که در شکل شماره ۴ مشاهده می شود، میزان بیان ژن های آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" در تمام گروه های تیماری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است؛ که این امر نشان دهنده القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی معده انسانی رده AGS نسبت به گروه کنترل می باشد؛ همچنین نتایج حاصل از تکنیک Real-time PCR نشان دهنده کاهش در میزان بیان ژن های متاستازی "MMP-2 – MMP-9" در گروه های تیماری نسبت به گروه کنترل بود. بیشترین افزایش بیان ژن های آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" و همچنین بیشترین کاهش بیان ژن های متاستازی "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 ژن های متاستازی در سلول های سرطانی AGS می باشد؛ ژن های "MMP-2 – MMP-9" از مهمترین ماتریکس متالوپروتئینازهایی (MMPهایی) هستند که در فرآیند مهاجرت و تهاجم سلول های سرطانی دخالت دارند و کاهش بیان این ژن ها باعث مهار توانایی مهاجرت سلول های سرطانی و همچنین جلوگیری از متاستاز به بافت های دورتر می شود.

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9



شکل ۴- بررسی میزان تغییرات در بیان ژن های آپوپتوزی و ژن های متاستازی توسط تکنیک Real-time PCR ($p<۰/۰۵^{*}$). 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 نتیجه گیری

با توجه به شواهدی مبنی بر خاصیت ضد سرطانی گیاهان جنس *Artemisia*؛ در این پژوهش تجربی برای اولین بار اثر هم افزایی عصاره متانولی *A. absinthium* و تاکسول بر روی سلول های سرطانی معده انسانی (رده سلولی AGS) و تغییرات سطح بیان ژن های آپوپتوزی " p53 - Caspase 3" - Caspase 9 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*، تاکسول و نیز کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* با تاکسول بر روی تکثیر سلول ها از آزمون MTT استفاده شد؛ برای بررسی آپوپتوز در سلول - های تحت تیمار از رنگ آمیزی DAPI و آنالیز فلوسایتومری استفاده شد؛ همچنین برای ارزیابی اثر ضد متاستازی گروه های تیماری از تست مهاجرت سلولی استفاده شد و در نهایت تغییرات در میزان بیان ژن های آپوپتوزی "Caspase 3,9, p53" و ژن های 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 می توانند به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش زیست پذیری سلول های سرطانی رده AGS شوند. بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که از کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول جهت تیمار سلول ها استفاده شد؛ به این صورت که در این محیط تیماری تکثیر سلول ها به طور قابل توجهی و در سطح معنی داری ($p<۰/۰۰۱^{***}$) مهار شد. این نتایج بیان گر این است که ترکیب عصاره *A. absinthium* با تاکسول اثر بیشتری بر مهار تکثیر سلول ها دارد؛ که این امر با توجه به کاهش میزان غلظت "IC_{50}" نسبت به زمانی که از عصاره *A. absinthium* و تاکسول به تنهایی استفاده کردیم، قابل اثبات است.

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

در سال ۲۰۱۴؛ Gordanian و همکاران به بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره پنج گونه مختلف *Artemisia* (از جمله *A. absinthium*) در برابر رده سرطانی MCF-7 پرداختند؛ نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره پنج گونه مختلف *Artemisia* به صورت وابسته به غلظت باعث مهار تکثیر سلول های سرطانی سینه می شوند، همچنین نشان دادند که فعالیت سیتوتوکسیک گونه های *A. absinthium* و *A. vulgaris* از سایر گونه های 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 سلول های سرطانی رده AGS بود. در سال ۲۰۱۸ Kim و همکاران؛ اثرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری عصاره اتانولی برگ های گیاه *Artemisia capillaris* در برابر رده های سلولی سرطانی Huh7 و HepG2 را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره *A. capillaris* تکثیر این سلول ها را به شدت سرکوب می کند و با افزایش سطح بیان کاسپاز-۳ باعث القای آپوپتوز در سلول های Huh7 و HepG2 می شود (۹)؛ که با تمامی نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو می باشد.

بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته ها با رنگ آمیزی DAPI نشان داد که در گروه های تیماری نسبت به گروه کنترل، تغییرات مورفولوژیکی دیده می شود؛ همان طور که در شکل شماره یک هم مشخص می باشد در گروه های تیماری هسته ها قطعه قطعه شده اند و از حالت نرمال خارج شده اند، که این امر می تواند نشانه ای برای وقوع آپوپتوز در این سلول ها می باشد؛ بیشترین آسیب سلولی و تغییرات در هسته ها زمانی اتفاق افتاده است که سلول ها با ترکیبی از عصاره *A. absinthium* و تاکسول تیمار شده اند. همچنین نتایج تست Annexin V-FITC نشان داد، در حالی که درصد زنده بودن سلول های گروه کنترل در حدود ۹۶درصد می باشد؛ این میزان در سلول های تیمار شده با عصاره *A. absinthium*، تاکسول و ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* با تاکسول، به ترتیب به ۴۸، ۴۷ و ۳۸ درصد کاهش داشته است؛ در نتیجه می توان بیان کرد که ترکیب عصاره *A. absinthium* به همراه تاکسول توانایی خوبی برای القای آپوپتوز در سلول های 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 سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره *A. annua* درصد سلول های آپوپتوتیک افزایش می یابد و همچنین تیمار با عصاره *A. annua* می تواند بیان ژن آنتی آپوپتیک Bcl-2 را کاهش و بیان ژن آپوپتوزی BAX را افزایش دهد و در نهایت نتیجه گرفتند که عصاره *A. annua* دارای توانایی القای آپوپتوز در رده سلولی HCT116 می باشد (۸)؛ تمامی نتایج تجربیات آزمایشگاهی حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در القای آپوپتوز در رده سلولی AGS بود.

نتایج Real-time PCR نشان داد که استفاده از ترکیب عصاره *A. absinthium* و تاکسول به صورت هم زمان می تواند باعث افزایش سطح بیان ژن های آپوپتوزی " p53 - Caspase 9 - Caspase 3" و کاهش بیان ژن های متاستازی "MMP-9 – MMP-2" در سلول های سرطانی رده AGS (در سطح معنی داری $p<0/05^{*}$) تحت تیمار شود؛ با توجه به نتایج حاصل از Real-time PCR می توان بیان کرد که ترکیب توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول توانایی قابل توجهی در بالا بردن سطح بیان ژن های آپوپتوزی و همچنین کاهش بیان ژن های متاستازی دارد و در آینده می تواند با مطالعات و تحقیقات کامل تر؛ بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

Tayarani-najaran و همکاران در سال ۲۰۱۶؛ به بررسی اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره دی کلرومتانی

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

Artemisia biennis در برابر رده های سلولی K562 و HL-60 پرداختند و نشان دادند که عصاره *A. biennis* باعث مهار تکثیر سلول های سرطانی می شود و با افزایش سطح بیان ژن آپوپتوزی BAX باعث القای آپوپتوز در سلول های K562 و HL-60 می شود (۲۰)؛ که با نتایج پژوهش حاضر که نشان دهنده توانایی عصاره *A. absinthium* در بالابردن سطح بیان ژن های آپوپتوزی هم راستا می باشد.

یافته های حاصل از این پژوهش تجربی نشان داد که کاربرد توأم عصاره *A. absinthium* و تاکسول تکثیر سلول های سرطانی معده رده AGS را به طور قابل توجهی مهار نموده و باعث القای آپوپتوز و کاهش قدرت تهاجم در این سلول ها می شود؛ لذا این ترکیب در آینده می تواند در مطالعات مربوط به درمان سرطان معده؛ مورد توجه و مطالعه بیشتری قرار گیرد.

سپاسگزاری

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 می شود.

منابع

1- 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.

2- 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.

3- 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.

4- 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.

5- 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.

6- 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.

7- 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.

8- 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.

9- 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.

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.

11- Lian, G., Li, F., Yin, Y., Chen, L. and Yang, J., 2018. Herbal extract of Artemisia vulgaris (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

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, trichomonacidal 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 2α,5α,10β,14β-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.

DOR: 20.1001.1.23832614.1401.35.1.5.9

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