مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۸، شماره‌ی ۷۰، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۵۸ تا ۶۷

سمیت فراکشن‌های جدا شده از آرتمیزیاهای بومی ایران بر رده‌ی سلول‌های سرطانی انسانی

دکتر احمد امامی[۱]، شهرزاد زمانی تقی‌زاده‌رابع[۲]، علی آهی[۳]، دکتر محمود محمودی[۴]

نویسنده‌ی مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده‌ی بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی mahmoudim@mums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۱۱/۳ پذیرش: ۸۸/۹/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: *برای بسیاری از سرطان‌ها درمان کامل وجود ندارد و اغلب به مرگ بیمار ختم می‌شوند. در این راستا اولین مرحله‌ی تحقیقاتی، ارزیابی کشندگی فراکشن‌های گیاهی بر سلول‌های سرطانی است. اعضای خانواده‌ی آرتمیزیا گیاهان دارویی مهمی در سرتاسر دنیا محسوب می‌شوند. در این تحقیق، تاثیر ضدسرطانی فراکشن‌های هفت گونه‌ی آرتمیزیای بومی ایران بر سلول‌های سرطانی و نرمال بررسی شد.*

روش بررسی: *فراکشن‌های اتانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی هفت گونه‌ی آرتمیزیای بومی ایران به روش عصاره‌گیری مرحله‌ای تهیه شد. سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی کشت داده شده با غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شده، میزان سمیت سلولی توسط تست MTT بررسی شد. نتایج به‌صورت IC_{50} گزارش شدند.*

یافته‌ها: *مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول‌های سرطانی توسط فراکشن‌های مختلف آرتمیزیاها مشاهده شد. بیشترین سمیت سلولی را فراکشن دی‌کلرومتانی آرتمیزیا Biennis بر سلول‌های سرطان رحم، فراکشن دی‌کلرومتانی آرتمیزیا Ciniformis بر سلول‌های سرطان معده، فراکشن دی‌کلرومتانی آرتمیزیا Diffusa بر سلول‌های سرطان کولون داشت. فراکشن‌های اتانلی، اتیل استاتی، دی‌کلرومتانی و هگزانی آرتمیزیا Biennis، فراکشن هگزانی آرتمیزیا Ciniformis، فراکشن هگزانی آرتمیزیا Santulina و فراکشن اتیل استاتی آرتمیزیا Vulgaris کمترین تاثیر کشندگی را بر سلول‌های سالم L929 نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *برخی فراکشن‌های جدا شده رشد سلول‌های سرطانی را به‌طور قابل توجه کاهش داده، هم‌زمان سمیت کمتری بر سلول‌های طبیعی داشتند. بنابراین بررسی آرتمیزیاها در پیشگیری یا درمان موثر و بی‌خطر سرطان‌های مختلف مفید می‌باشد. بررسی تاثیر فراکشن‌های موثر بر القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی و تعیین مکانیسم تاثیر آن‌ها توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: آرتمیزیا، رده‌ی سلول‌های سرطانی، سمیت سلولی، تست MTT

مقدمه

با در نظرگیری توجه روزافزون به درمان سرطان‌های مختلف با حداقل سمیت و هزینه برای بیماران، استفاده از مواد طبیعی مثل فراکشن‌های گیاهی برای درمان بیماران مبتلا به سرطان‌های مختلف از جمله سرطان‌های کبد،

۱- دکترای تخصصی فارماکوگنوزی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده‌ی بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- کارشناس گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده‌ی بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی،

کولون، معده، رحم و پستان که درمان کاملی برای آن‌ها وجود ندارد و به مرگ بیمار ختم می‌شوند، بسیار مورد توجه می‌باشد. در این راستا اولین مرحله‌ی تحقیقاتی ارزیابی تاثیر کشندگی فراکشن‌های گیاهی بر رده‌های سلول‌های سرطانی مذکور می‌باشد. یکی از استراتژی‌هایی که به‌طور رایج در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود، جلوگیری از سنتز DNA یا میتوز از طریق بلوکه کردن پیشرفت سیکل سلولی در سلول‌های پرئوپلاستیک و بدخیم می‌باشد. مواد دارویی گیاهی متنوعی (Phytochemicals) در گیاهان مختلف وجود دارند که با متوقف کردن رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم یا ترانسفرم شده، تاثیر کشندگی بر آن‌ها دارند (۱). اعضای خانواده‌ی گیاه آرتمیزیا (درمنه)، گیاهان دارویی مهمی در سرتاسر دنیا محسوب می‌شوند. آرتمیزیا گونه‌های مختلفی دارد و بعضی از گونه‌های آن تنها بومی ایران می‌باشد. آرتمیزیاها حاوی مواد مؤثره‌ی آلفا توجون، بتا توجون، کاریوفیلن می‌باشند. تاثیر سمیت سلولی بعضی از گونه‌های آرتمیزیا بر بعضی از رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است. بررسی بر روی تاثیر بسیاری از آرتمیزیاها به‌خصوص آرتمیزیاهای بومی ایران بر سمیت سلول‌های سرطانی صورت نگرفته بود. به منظور یافتن ترکیبات گیاهی ضدسرطانی قوی و بی‌خطر از میان گیاهان بومی کشور، در این تحقیق تاثیر فراکشن‌های اتانلی، اتیل استاتی، دی کلرو متانی و هگزانی هفت گونه از آرتمیزیاهای بومی کشور بر رده‌ی سلول‌های سرطانی معده (AGS)، کولون (HT-29)، پستان (MCF-7) و سرویکس (Hela) و سلول‌های فیبروبلاستی نرمال (L929) با استفاده از تست MTT بررسی شد. عصاره‌ی متانولی آرتمیزیا (*Argyi*) و ترکیب فلاونی جاسوسیدین (Jaceosidin) موجود در آن تکثیر چندین رده‌ی سلولی توموری از جمله سلول‌های سرطانی سرویکس (Hela) را مهار می‌کند (۳و۲). آرتمیزیای *Asiatica* و ترکیب یوپاتیلین (Eupatilin) آن با مکانیسم شناخته شده‌ای سبب القای آپوپتوز سلول‌های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سلول‌های سرطان معده (AGS) می‌شود (۵و۴). تاثیر کشندگی آرتمیزیا *Capillaris*، آرتمیزیا *Iwayomogi* و آرتمیزیا *Princep* نیز بر رده‌ی سلول‌های سرطانی مختلف نشان داده شده است (۸و۶،۷). آرتمیزین (Artemisinin) جدا شده از آرتمیزیا *Annua* نیز در شرایط برون تنی کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی از جمله رده‌ی سلولی هپاتوکارسینوما داشته، از ایجاد سرطان پستان در موش‌های تیمار شده با ماده سرطان‌زای DMBA جلوگیری می‌کند (۱۰و۹).

روش بررسی

تهیه فراکشن‌های آبی، اتانولی، اتیل استاتی و دی‌کلرومتانی و هگزانی از اندام‌های هوایی هفت گونه آرتمیزیای بومی ایران: در این مطالعه‌ی تجربی، هفت گونه‌ی ***A.Biennis, A.Ciniformis, A.Diffusa, A.Khorassanica, A.Persica, A.Vulgaris, A.Santulina*** از آرتمیزیاهای بومی ایران جمع‌آوری شدند. این گیاهان در فصل تابستان از مناطق وحشی چیده شده، توسط دکتر مظفریان (مرکز تحقیقات مراتع و جنگل‌ها، وزارت جهاد کشاورزی، ایران) شناسایی گردیدند. گیاهان جمع‌آوری شده بعد از خشک شدن، پودر شده، در حلال‌های اتانول، اتیل استات، دی کلرومتان و هگزان حل شدند. روش عصاره‌گیری مرحله‌ای بود و به دنبال هم انجام گرفت. حذف حلال توسط تبخیر صورت گرفت.

سلول‌های سرطان معده (AGS)، کولون (HT-29)، پستان (MCF-7) و رحم (Hela) و سلول‌های فیبروبلاستی L929 از بانک سلولی انستیتوپاستورایران تهیه شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM یا RPMI و FCS ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین ریخته شده، در دمای

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور دی‌اکسید کربن‌دار نگهداری شدند. برای انجام تست‌های مختلف زمانی که حداقل ۷۰ درصد سلول‌ها در فلاسک کشت به رشد کافی رسیدند، توسط تریپسین-EDTA از ته فلاسک جدا شده، با دور rpm ۱۱۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی در ۱ سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآورده شده، درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از هموسیتومتر تعیین شد. از سلول‌های با درصد زنده بودن بالاتر از ۹۰ درصد برای انجام تست‌ها استفاده شد. ابتدا غلظت اولیه ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از فراکشن‌ها در محیط کشت تهیه شد و با عبور دادن از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد. سپس غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط کشت تهیه شد. تعداد ۲×۱۰^{۴} عدد سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شدند. برای هر غلظت حداقل سه چاهک اختصاص داده شد. همچنین از سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها به‌صورت گروه‌های مختلف تست با غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها (۲۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و محیط کشت مناسب تیمار شدند. همچنین از سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل استفاده شد. از سلول‌های تیمار شده با ترکیب ضد سرطانی ۵-فلورو اوراسیل (5-FU) با غلظت $۱۰^{-۳}$ مولار نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و تاثیر آن بر سلول‌های مورد بررسی به صورت درصد کشندگی نشان داده شد.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از تست MTT:

به منظور بررسی تاثیر فراکشن‌های اتانولی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی هفت گونه آرتمیزیای بررسی شده بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی کشت داده شده از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد (۱۱). اساس این تست شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه‌ی این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT (از شرکت Sigma با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه گردید. سپس مایع رویی هر چاهک خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر ازDMSO به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای تشکیل شده در ته چاهک‌ها به‌طور کامل حل شوند. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه خواننده‌ی الیزا (Stat Fax-2600) در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد. نتایج حاصله به‌صورت IC_{50} (غلظتی که سبب کشته شدن نیمی از سلول‌ها شود) از روی منحنی غلظت (میکروگرم در میلی‌لیتر) درصد مهار سلولی گزارش شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فراکشن‌ها بر سمیت سلولی توسط تست MTT:

تاثیر فراکشن‌های اتانلی، اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی هفت گونه از آرتمیزیاهای بومی ایران و نیز تاثیر استفاده از 5-FU (به عنوان کنترل مثبت) بر سمیت سلول‌های سرطان معده (AGS)، کولون (HT-29)، پستان (MCF-7) و رحم (Hela) و سلول‌های فیبروبلاستی L929 توسط تست MTT بررسی شد. نتایج در جدول ۱ گزارش شده است.

جدول.۱: نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فراکشن‌های هفت گونه‌ی آرتمیزیا بر سمیت سلولی بر حسب IC_{50} (میکروگرم در میلی‌لیتر) .

		IC_{50} (غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد)				
گونه‌های آرتمیزیا	**نوع فرکشن**	**MCF-7**	**L929**	**HT-29**	**Hela**	**AGS**
آرتمیزیا ***Biennis***	**اتانلی**	۴۵۱	۴۰۱	۹۲۵	۲۸۸	۵۲۵
	اتیل استاتی	۱۲۲۴	۱۳۵۰	۱۱۰۰	۱۰۵۰	۹۶۳
	دی کلرومتانی	۴۵۱	۹۰۲	۳۳۷	۷۴	۳۳۷
	هگزانی	۳۳۸	۵۳۸	۱۳۱	۳۰۱	۴۶۳
آرتمیزیا ***Ciniformis***	**اتانلی**	۷۳	۷۹	۳۸۸	۱۳۰	۶۰
	اتیل استاتی	۶۴	۱۶۸	۱۲۵۲	۷۳	۷۵۰
	دی کلرومتانی	۲۹	۸۲	۹۴	۹۷	۳۵
	هگزانی	۳۶۳	۴۹۸	۳۳۷	۳۰۰	۲۰۵
آرتمیزیا ***Diffusa***	**اتانلی**	۱۱۵	۱۲۰۰	۸۵۱	> ۲۰۰۰	۳۳۸
	اتیل استاتی	۱۰۳	۱۵۳	۱۵۵	۱۵۴	۳۲۵
	دی کلرومتانی	۸۸	۳۸۸	۴۲	۷۱	> ۲۰۰۰
	هگزانی	> ۲۰۰۰	۸۴	۳۷۵	۲۰۵	۱۳۸
آرتمیزیا ***Khorassanica***	**اتانلی**	۷۶	۱۳۳	۹۷	۴۶۵	۱۵۲
	اتیل استاتی	۶۲	۹۲	۱۰۷۵	۳۱۲	۹۶
	دی کلرومتانی	۵۷	۱۹۸	۷۳۸	۷۷	۶۷
	هگزانی	۲۸۸	۲۰۵	۱۳۸	۹۱	۲۶۳
آرتمیزیا ***Persica***	**اتانلی**	۴۳۸	۱۹۸	۶۸۸	> ۲۰۰۰	۶۷۵
	اتیل استاتی	۳۷۶	۲۷۵	۲۵۳	۲۴۸	۱۶۰
	دی کلرومتانی	۸۱۲	۲۵۷	۲۰۵	۲۱۹	۸۰۰
	هگزانی	۳۰۱	۱۸۸	۱۱۳	۱۳۸	۳۳۷
آرتمیزیا ***Santulina***	**اتانلی**	۵۲۶	۱۲۷۶	> ۲۰۰۰	> ۲۰۰۰	۱۲۲۶
	اتیل استاتی	۳۸۷	۲۸۸	۳۰۱	۲۲۱	۷۱۳
	دی کلرومتانی	۳۶۴	۳۱۳	۹۱	۵۳۸	۱۵۳
	هگزانی	۷۶	۵۳۹	۱۳۰	۳۵۷	۱۴۵
آرتمیزیا ***Vulgaris***	**اتانلی**	۵۵۱	۹۱۳	۱۸۵۰	> ۲۰۰۰	۵۸۸
	اتیل استاتی	۵۷	۵۳۸	۵۰۵	۳۸۷	۵۰۵
	دی کلرومتانی	۱۱۲۵	۷۵۵	۳۶۳	۳۵۱	۵۶۳
	هگزانی	۱۹۵۱	۴۵۱	۲۸۸	۱۶۰	۱۵۳

آرتمیزیا Biennis: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی Hela، L929، MCF-7، AGS و

HT-29 به ترتیب با IC_{50} : ۲۸۸، ۴۰۱، ۴۵۱، ۵۲۵ و ۹۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطان AGS، Hela، HT-29، MCF-7 و L929 به ترتیب با IC_{50}: ۹۶۳، ۱۰۵۰، ۱۱۰۰، ۱۲۲۴ و ۱۳۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی Hela، AGS، HT-29، MCF-7 و L929 و به ترتیب با IC_{50}: ۷۴، ۳۳۷، ۳۳۷، ۴۵۱ و ۹۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی HT-29، Hela، MCF-7، AGS و L929 به ترتیب با IC_{50}: ۱۳۱، ۳۰۱، ۳۳۸، ۴۶۳ و ۵۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا ***Ciniformis***: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی AGS، MCF-7، L929، Hela و HT-29 به ترتیب با IC_{50}: ۶۰، ۷۳، ۷۹، ۱۳۰ و ۳۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطان MCF-7، Hela، L929، AGS و HT-29 و به ترتیب با IC_{50}: ۶۴، ۷۳، ۱۶۸، ۷۵۰ و ۱۲۵۲میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، AGS، L929، HT-29 و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۲۹، ۳۵، ۸۲، ۹۴ و ۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی AGS، Hela، HT-29، MCF-7 و L929 به ترتیب با IC_{50}: ۲۰۵، ۳۰۰، ۳۳۷، ۳۶۳ و ۴۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا ***Diffusa***: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، AGS، HT-29، L929 و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۱۱۵، ۳۳۸، ۸۵۱، ۱۲۰۰ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، L929، Hela، HT-29 و AGS به ترتیب با IC_{50}: ۱۰۳، ۱۵۳، ۱۵۴، ۱۵۵ و ۳۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی HT-29، Hela، MCF-7، L929 و AGS و به ترتیب با IC_{50}: ۴۲، ۷۱، ۸۸، ۳۸۸ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی L929 ، AGS، Hela، HT-29 و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۸۴، ۱۳۸، ۲۰۵، ۳۷۵ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا ***Khorassanica***: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، HT-29، L929، AGS و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۷۶، ۹۷، ۱۳۳، ۱۵۲ و ۴۶۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطان MCF-7، L929، AGS، Hela و HT-29 و به ترتیب با IC_{50}: ۶۲، ۹۲، ۹۶، ۳۱۲ و ۱۰۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، AGS، Hela، L929 و HT-29 و به ترتیب با IC_{50}: ۵۷، ۶۷، ۷۷، ۱۹۸ و ۷۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی Hela، HT-29، L929، HT-29، AGS و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۹۱، ۱۳۸، ۲۰۵، ۲۶۳ و ۲۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا ***Persica***: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی L929، MCF-7، AGS، HT-29 و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۱۹۸، ۴۳۸، ۶۷۵، ۶۸۸ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی AGS، Hela، HT-29، L929 و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۱۶۰، ۲۴۸، ۲۵۳، ۲۷۵ و ۳۷۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی

HT-29، Hela، L929، AGS و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۲۰۵، ۲۱۹، ۲۵۷، ۸۰۰ و ۸۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی HT-29، Hela ، L929، MCF-7 و AGS و به ترتیب IC_{50}: ۱۱۳، ۱۳۸، ۱۸۸، ۳۰۱ و ۳۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا Santulina: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، AGS، L929، Hela و HT-29 و به ترتیب با IC_{50}: ۵۲۶، ۱۲۲۶، ۱۲۷۶، بیشتر از ۲۰۰۰ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطان Hela، HT-29، L929، MCF-7 و AGS و به ترتیب با IC_{50}: ۲۲۱، ۲۸۸، ۳۰۱، ۳۸۷ و ۷۱۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی HT-29، AGS، MCF-7، Hela و L929 و به ترتیب با IC_{50}: ۹۱، ۱۵۳، ۳۶۴، ۵۳۸ و ۵۳۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، HT-29، AGS، L929 و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۷۶، ۱۳۰، ۱۴۵، ۳۱۳ و ۳۵۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

آرتمیزیا *Vulgaris*: بیشترین تاثیر فراکشن اتانلی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، AGS، L929، HT-29 و Hela و به ترتیب با IC_{50}: ۵۵۱، ۵۸۸، ۹۱۳، ۱۸۵۰ و بیشتر از ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن اتیل استاتی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی MCF-7، Hela، HT-29، AGS و L929 و به ترتیب با IC_{50}: ۵۷، ۳۸۷، ۵۰۵، ۵۰۵ و ۵۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن دی کلرومتانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی Hela، HT-29، AGS، L929 و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۳۵۱، ۳۶۳، ۵۶۳، ۷۵۵ و ۱۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیشترین تاثیر فراکشن هگزانی به ترتیب بر سلول‌های سرطانی AGS، Hela، HT-29، L929 و MCF-7 و به ترتیب با IC_{50}: ۱۵۳، ۱۶۰، ۲۸۸، ۴۵۱ و ۱۹۵۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. میزان کشندگی سلول‌های تیمار شده با غلظت 10^{-3} مولار از ترکیب ضد سرطانی ۵- فلئورو اوراسیل (به عنوان کنترل مثبت) بر سلول‌های سرطانی Hela، HT-29، AGS، MCF-7 و L929 به ترتیب ۳۲، ۵۷، ۲۰، ۳۰ و صفر درصد بود (جدول ۲).

جدول۲: نتایج حاصل از تاثیر ۵- فلئورو اوراسیل (10^{-3} مولار) بر سمیت سلولی

نوع سلول	L929	MCF-7	HT-29	Hela	AGS
کشندگی سلولی (درصد)	۰	۳۰	۵۷	۳۲	۲۰

بحث

سرطان از بزرگترین عوامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است. امروزه از روش‌های درمانی متعددی برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود، ولی متأسفانه در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب همراه می‌باشد. بنابراین، با توجه به عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع بیماری، تحقیق در جهت تولید داروهایی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امری ضروری است. ترکیبات طبیعی بسیاری با اثرات بیولوژیکی متنوع وجود دارند که حدود ۷۵ درصد از داروهای ضدسرطانی را در علم داروسازی نوین شامل می‌شوند. بسیاری از این ترکیبات از گیاهان مشتق شده و در درمان سرطان های مختلف موثرند (۱۳و۱۲). بر طبق نتایج حاصله (جدول ۱)، فراکشن دی کلرومتانی آرتمیزیا *Biennis* بیشترین سمیت سلولی را بر سلول‌های سرطان رحم (Hela) داشت و درصد مهار رشد این سلول‌ها توسط این فراکشن بیشتر از عصاره‌ی متانولی آرتمیزیا *Argyi* و ترکیب فلاونی جاسوسیدین (Jaceosidin)

موجود در آن بود (۳و۲). فراکشن اتانلی آن بیش از سایرین کشنده بود. هیچ‌کدام از فراکشن‌ها نسبت به سلول‌های سرطانی تاثیر زیادی بر سلول‌های فیبروبلاستی نداشتند. فراکشن دی کلرومتانی آرتمیزیا *Ciniformis* همانند آرتمیزیا *Asiatica* و ترکیب یوپاتیلین (Eupatilin) آن کشندگی بسیار بالایی برای سلول‌های سرطان معده (AGS) داشت (۵و۴). به‌طور کلی فراکشن‌های دی کلرومتانی و سپس اتانلی آرتمیزیا *ciniformis* تاثیر کشندگی بسیار بالایی برای تمام سلول‌های سرطانی داشتند. فراکشن دی کلرومتانی آرتمیزیا *Diffusa* تاثیر کشندگی بالاتری نسبت به سایر فراکشن‌ها داشت و حساس‌ترین رده‌ی سلولی بر این فراکشن سلول‌های سرطان کولون (HT-29) بود. از میان فراکشن‌های مختلف آرتمیزیا *Khorassanica*، فراکشن دی کلرومتانی کشنده‌تر از سایرین بود و بیشترین تاثیر کشندگی را بر سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) داشت. اگرچه بعد از آن، عصاره‌ی اتیل استاتی و عصاره‌ی اتانلی آن نیز تاثیر کشندگی بالایی بر این سلول‌های داشتند. فراکشن‌های مختلف آرتمیزیا *persica* تاثیر کشندگی بالایی برای هیچ‌یک از سلول‌های سرطانی نداشتند و از میان آن‌ها، بیشترین کشندگی را فراکشن هگزانی بر سلول‌های سرطان کولون (HT-29) داشت. فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Santulina* تاثیر کشنده‌ی بالایی بر سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) و فراکشن دی کلرومتانی آن کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطان کولون (HT-29) داشتند.

به‌طور کلی فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Santulina* کشنده تر از سایرین بود. تنها فراکشن اتیل استاتی آرتمیزیا *Vulgaris* کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) داشت و سایر فراکشن‌ها کشندگی بالایی نداشتند. آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شده از آرتمیزیا *Annua* نیز از ایجاد سرطان پستان در موش‌های تیمار شده با ماده سرطان‌زای DMBA جلوگیری می‌کند (۱۰و۹). فراکشن‌های مختلف آرتمیزیاها اثرات متفاوتی بر سمیت سلول‌های سالم L929 داشتند. از میان فراکشن‌های مختلف آرتمیزیا *Biennis*، تمامی فراکشن‌ها به‌جز فراکشن اتانلی سمیت انتخابی بر سلول‌های سرطانی داشتند و سمیت آن‌ها بر سلول‌های L929 کمتر از سلول‌های سرطانی مورد بررسی بود. فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Ciniformis* کمترین کشندگی را بر سلول‌های سالم داشت. تاثیر کشندگی سایر فراکشن‌های جدا شده از آن بر سلول‌های سرطانی و سالم متفاوت بود. فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Diffusa* سمیت بالایی بر سلول‌های L929 داشت و برخی از سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم حساس‌تر و برخی مقاوم‌تر بودند. برطبق نتایج حاصل از تاثیر کشندگی فراکشن‌های جدا شده از آرتمیزیا *Khorassanica* و آرتمیزیا *Persica*، برخی از سلول‌های سرطانی مورد بررسی نسبت به سلول‌های سالم حساس‌تر و برخی به آن‌ها مقاوم‌تر بودند. فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Santulina* و فراکشن اتیل استاتی آرتمیزیا *Vulgaris* کمترین تاثیر کشندگی را بر سلول‌های سالم L929 نشان دادند و تاثیر کشندگی آن‌ها بر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم متفاوت بود. فراکشن‌های اتیل استاتی، دی کلرومتانی و هگزانی آرتمیزیا *Biennis*، فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Ciniformis*، فراکشن هگزانی آرتمیزیا *Santulina* و فراکشن اتیل استاتی آرتمیزیا *Vulgaris* کمترین تاثیر کشندگی را بر سلول‌های سالم L929 نشان دادند. همان‌طور که ذکر شد فراکشن‌های مختلف گونه‌های مختلف آرتمیزیا تاثیر کشندگی بسیار متفاوتی بر سلول‌های سرطانی مختلف داشتند و نمی‌توان تنها یک نوع فراکشن را در تمامی آنها موثر دانست و یا سلول سرطانی خاصی را به تمامی آرتمیزیاها حساس دانست که این امر می‌تواند به دلیل تعداد زیاد مواد موثره موجود در فراکشن‌های مختلف (قطبی تا غیر قطبی) آرتمیزیاها باشد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از فراکشن‌های جدا شده از آرتمیزیاهای مورد بررسی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف را به‌طور قابل توجه کاهش دادند و هم‌زمان سمیت کمتری بر سلول‌های طبیعی داشتند،از این روی آرتمیزیاها ممکن است در پیشگیری یا درمان موثر و بی‌خطر سرطان‌های مختلف مفید باشند. بررسی تاثیر فراکشن‌های موثر بر القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی و نیز تعیین مکانیسم تاثیر آن‌ها نیز توصیه می‌شود.

References

1- Hwang JS. AIP1, a Water-Soluble Fraction from *Artemisia iwayomogi*, suppresses thymocyte apoptosis in vitro and down-regulates the expression of fas gene. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28: 921-4.

2- Lee HG. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J Ethnopharmacol*. 2005; 98: 339-43.

3- Seo JM, Kang HM, Son KH, et al. Antitumor activity of flavones isolated from Artemisia argyi. *Planta Med*. 2003; 69: 218-22.

4- Seo HJ, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from artemisia plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutagen*. 2001; 496: 191-8.

5- Kim MJ, Kim DH, Na HK, Oh TY, Shin CY, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from artemisia plants, induces apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2005; 24: 261-9.

6- Hu YQ, Tan RX, Chu MY, Zhou J. Apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 induced by water-soluble macromolecular components of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91: 113-7.

7- Jeong S.H. Induction of apoptosis by yomogin in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27: 1106-11.

8- Nakamura Y. A diacetylenic spiroketal enol ether epoxide, AL-1, from artemisia lactiflora inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion possibly by suppression of oxidative stress. *Cancer Letters.* 1999; 140: 37-45.

9- Li Y, Li MY, Wang L, Jiang ZH, Li WY, Li H. Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of Artemisia Annua L. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004; 35: 337-9.

10- Lai HP, Singh N. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer Letters*. 2006; 231: 43-8.

11- Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to

proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.

12- Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM. Natural Products as sources of new drugs over the period. *J Nat Prod.* 2003; 66: 1022-37.

13- Srivastara V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem*. 2005; 13: 5892-908.

Study onToxic Effects of Artemisisa Spp. Fractions from Iran on Human Cancer Cell Lines

Emami A[1], Zamani Taghizadeh Rabe SH[2], Ahi A[1], Mahmoudi M[2]

[1]School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.

[2]Immunology Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences.

***Corresponding Author*:** Mahmoudi M, Immunology Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences.

E-mail: mahmoudim@mums.ac.ir

Received: 22 Jan 2009 **Accepted:** 20 Dec 2009

Background and Objective: For most of cancers there is no treatment and most of them ended in death. So, the first investigational stage is evaluation of toxic effects of drug fractions on cancer cells. Artemisia species are important medicinal plants throughout the world. In this study, anti-tumoral effects of seven Artemisia spp. fractions from Iran were studied on cancer and normal cells.

Material and Methods: Ethanol, ethylacetate, dichloromethane and hexane fractions of seven Artemisia species from Iran were prepared by step to step procedure. Cultivated cancer and fibroblast cells were incubated with different concentrations of fractions for 72 hours and cytotoxicity was determined using MTT assay. Results were reported as IC_{50} (concentration that kills 50 percent of cells).

Results: Obtained results showed strong and dose-dependent inhibition of cancer cell growth by different Artemisia fractions. The most cytotoxicity effects were for dichloromethane fraction from Artemisia biennis on cervix cancer cells, dichloromethane fraction from Artemisia ciniformis on gastric cancer cells and dichloromethane fraction from Artemisia diffusa on colon cancer cells. Ethylacetate, dichloromethane and hexane fractions from Artemisia biennis, hexane fraction from Artemisia ciniformis, hexane fraction from Artemisia santulina and ethylacetate fraction from Artemisia vulgaris had the least toxic effect on normal L929 cells.

Conclusion: Some isolated fractions caused a significant decrease in cancer cell growth and had less toxicity on normal cells. So, study on Artemisia in prevention or efficient treatment of different cancers is useful. Study the effect of effective fractions on apoptosis induction and determination of their mechanisms of actions is suggested.

Key words: Artemisia, Cancer cell lines, Cytotoxicity, MTT assay