

تأثیر عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه درمنه خزری (*Artemisia annua*) بر تکثیر و مرگ سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌های Reh و Nalm-6

پرگل مشاتی^۱، سمیه اسماعیلی^۲، نسرين دهقان نیری^۳، مینا درویشی^۱، احمد قره‌باغیان^۴

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، شایع‌ترین بدخیمی در کودکان محسوب می‌شود. با توجه به اثرات جانبی شیمی درمانی، امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی برای درمان بدخیمی‌ها مورد توجه بسیار قرار گرفته است. اثر مهار آرتمیسیا آنوا (درمنه خزری) بر روی چندین رده سلولی سرطانی گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سمیت این عصاره بر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های Reh و Nalm-6 کشت داده شدند و سپس با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه تیمار و با کمک آزمون MTT، درصد سلول‌های زنده بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. از آزمون فلوسیتومتری Annexin V-FITC و سنجش فعالیت کاسپاز ۳ جهت ارزیابی القای آپوپتوز استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون one-way ANOVA انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که IC50 عصاره پس از ۴۸ ساعت در رده Nalm-6، ۹۰ µg/mL و در رده Reh، ۷۰ µg/mL می‌باشد، به همین ترتیب پس از ۷۲ ساعت نیز دارای اثر کشندگی بالایی به نسبت گروه کنترل بود (p < ۰/۰۰۱). نتایج آزمون فلوسیتومتری حاکی از افزایش آپوپتوز با غلظت ۴۰ µg/mL عصاره می‌باشد (p < ۰/۰۵). افزایش قابل توجه فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های تیمار شده نیز مشاهده شد (p < ۰/۰۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره متانولی بخش‌های هوایی گیاه آرتمیسیا آنوا سبب مهار رشد قابل توجه سلول‌های رده Reh و Nalm-6 شد.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، آرتمیسیا آنوا، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد خورشناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۲- PhD فارماکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات طب سنتی و مفردات پزشکی - دانشکده طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی دکتری پروتئومیکس - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۴- مؤلف مسئول: PhD ایمونوهماولوژی بالینی - استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - خیابان شریعتی - تهران - ایران - کد پستی: ۱۵۴۶۸-۱۵۵۱۴

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL)، به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان در کودکان زیر ۱۵ سال شناخته می‌شود. با وجود پیشرفت‌های بسیار در راه‌کارهای درمانی که منجر به درمان بیش از ۹۰٪ کودکان مبتلا به ALL شده است، عوارض ناشی از درمان همچنان باقی است و به عنوان دومین عامل مرگ و میر مرتبط با سرطان در کودکان شناسایی شده است (۴-۱). از آن جایی که گیاهان دارویی به علت داشتن منشا طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانسیم‌های زنده از جمله بدن انسان بوده و عوارض جانبی کمتری هم ایجاد می‌کند، لذا به عنوان منبع بالقوه مکمل داروهای شیمی درمانی جدید مورد توجه ویژه هستند (۵). بیش از ۵۰٪ داروها در آزمایش‌های بالینی، برای تعیین فعالیت ضد سرطانی، از منابع طبیعی مشتق شده‌اند یا به آن‌ها وابسته‌اند (۶). آرتمیسیا آنوا متعلق به خانواده Compositae می‌باشد. این جنس در ایران ۳۴ گونه علفی یک ساله و چند ساله دارد که در سراسر ایران پراکنده‌اند. پراکندگی جغرافیایی این گیاه به وسعت ایران بوده از دشت‌های پست ساحلی تا ارتفاعات کوهستانی می‌رویند. نام محلی این گیاه، درمنه خزری، درمنه یک ساله یا گندواش است. آرتمیزینین (Artemisinin) جدا شده از *A. annua* به عنوان یک داروی قوی ضد مالاریایی شناخته شده است (۷). تاثیر سمیت سلولی برخی از گونه‌های آرتمیسیا بر بعضی از رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است. عصاره متانولی *Artemisia argyi* و ترکیبات فنولی جاسئوسیدین (Jaceosidin) موجود در آن، تکثیر چندین رده سلولی توموری از جمله سلول‌های سرطانی سرویکس (Hela) را مهار می‌کند (۸).

Artemisia asiatica و ترکیب یوپاتیلین (Eupatilin) آن با مکانیسم شناخته شده‌ای سبب القای آپوپتوز سلول‌های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سلول‌های سرطان معده (ASG) می‌شود (۹). عصاره متانولیک برگ *Artemisia vulgaris* به عنوان عامل ضد سرطانی بر روی رده‌های سلولی HepGZ، تایید شده است (۱۰). عصاره متانولی *Artemisia annua* روی رده‌های سلولی AGS، HELA، HT-29 و MCF-7 مهار قوی و وابسته به غلظت تکثیر سلول‌های سرطانی

مختلف را نشان داد (۱۱). در فرآیند آپوپتوز، کاسپازها نقش مهمی ایفا می‌کنند. کاسپازها، سیستئین پروتئازهایی هستند که به شکل پروآنزیم وجود دارند و در اثر شکسته شدن فعال می‌شوند (۱۳، ۱۲). دو مسیر جایگزین برای شروع فرآیند آپوپتوز وجود دارد: مسیر خارجی که وابسته به گیرنده‌های مرگ موجود بر سطح سلول است و مسیر داخلی که وابسته به میتوکندری می‌باشد. در هر دو مسیر، کاسپازها فعال می‌شوند (۱۴). مسیر خارجی و داخلی به یک مسیر مشترک ختم می‌شوند که با شکستن کاسپاز ۳ آغاز شده و نهایتاً منجر به شکستن DNA، دژنره شدن پروتئین‌های هسته‌ای، شکل‌گیری اجسام آپوپتوتیک، بیان لیگاند برای گیرنده‌های سلول‌های فاگوسیت‌کننده و در آخر جذب توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده منتهی خواهد شد (۱۵). در این مرحله از آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به سطح خارجی غشای سلول می‌آید. فسفاتیدیل سرین‌ها به طور طبیعی در لایه داخلی سیتوپلاسم غشای سلول‌های زنده قرار گرفته‌اند (۱۶).

انکسین ۷ دارای جایگاه اتصال به فسفاتیدیل سرین است. اخیراً مشخص شده هر نوع سلول دارای مکانیسمی است که باعث ظاهر شدن فسفاتیدیل سرین در سطح سلول می‌شود، که این مکانیسم طی آپوپتوز فعال می‌شود. جهت درک مکانیسم مرگ سلولی از آزمون فلوسیتومتری Annexin V-FITC استفاده می‌شود (۱۷). در این مطالعه، بررسی فعالیت کاسپاز ۳ به دلیل اهمیت آن در هر دو مسیر آپوپتوز صورت گرفت.

در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر عصاره آرتمیسیا آنوا را بر سلول‌های سرطانی لنفوبلاستیک حاد شامل Nalm-6 و Reh مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره:

در این مطالعه تجربی، این گیاه از استان گلستان، کلاله در شمال ایران جمع‌آوری شد. ۱۰ گرم از پودر خشک شده از نواحی هوایی در مرحله زایشی گیاه توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر متانل (به نسبت ۱ به ۱۰) با استفاده از روش خیساندن (maceration) پس از ۲۴ ساعت عصاره‌گیری

شد (۱۸). عصاره‌های به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی از پودر گیاه جدا شده و سپس با دستگاه روتاری در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در ویال ریخته شد. عصاره تغلیظ شده در زیر هود خشک و تا قبل از بررسی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای آماده‌سازی و رساندن آن به غلظت مورد نظر، ابتدا میزان ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره در میکروتیوب با ترازوی دیجیتال وزن شده و سپس در ۱ میلی‌لیتر DMSO استریل حل شدند (غلظت نهایی استوک اولیه عصاره ۱۰۰ mg/mL بود). با توجه به رقیق نمودن استوک اولیه عصاره، جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز برای مطالعه، غلظت نهایی DMSO به کمتر از ۰/۱ DMSO رسیده و نیازی به کنترل DMSO نبود.

کشت سلولی و تیمار سلول‌ها با عصاره:

رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شد. به منظور کشت سلولی ابتدا سلول‌ها از تانک ازت خارج و یخ‌زدایی شدند، سپس در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (جیبکو) حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین کشت داده شدند. فلاسک‌های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. بعد از این که سلول‌ها به قدر کافی رشد کردند، ۳ × ۱۰^۵ از هر سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از محیط کشت استریل تهیه شدند. همه آزمایش‌ها به صورت شش تایی و در حداقل سه آزمایش جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون MTT به منظور سنجش فعالیت متابولیک:

پس از تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آرتمیسیا آنوا و اتمام زمان انکوباسیون، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (4,5-dimethyl diphenyl tetrazolium bromid) اضافه نموده و مجدداً به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سپس پلیت‌ها را با دور ۲۹۰۰ g به مدت ۹ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محیط کشت رویی دور ریخته شد. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری هاست، احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند (سلول‌های زنده) رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیر محلول بوده و بایستی قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به حالت محلول درآیند. بنابراین بعد از تخلیه محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. سپس جذب خانه‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با جذب خانه‌های حاوی سلول‌های کنترل مقایسه شده و درصد سلول‌های زنده به روش زیر محاسبه گردید.

$$100 \times \left(\frac{\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده با عصاره در هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه‌های حاوی سلول‌های کنترل}} \right) = (\%) \text{ میزان سلول‌های زنده}$$

آزمون فلوسیتومتری به منظور سنجش میزان آپوپتوز:

ابتدا سلول‌ها در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ گاز CO₂ به منظور دسترسی به جمعیت مورد نظر کشت شدند. طبق دستور کیت (eBioscience, Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC) برای هر آزمون به ۳ × ۱۰^۵ سلول نیاز است. به همان صورت که بیان شد، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار شده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، سلول‌ها به لوله‌های فالكون منتقل شده و سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آن دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر باندکننده به سلول‌های تیمار شده اضافه شد، سپس به ویال مربوط به انجام فلوسیتومتری منتقل شدند. در نهایت ۵ میکرولیتر انکسین V و ۱۶ میکرولیتر PI به ویال اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شده است. در نهایت ویال‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد.

پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج nm ۴۵۰-۴۰۰ خوانده شد.

آزمون‌های آماری:

آنالیز آماری داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS ۲۳ صورت گرفت. از آزمون one-way ANOVA برای ارزیابی اختلاف آماری بین گروه‌های تیمار شده و کنترل استفاده شد و $p < 0/05$ از لحاظ آماری معنادار تلقی گردید.

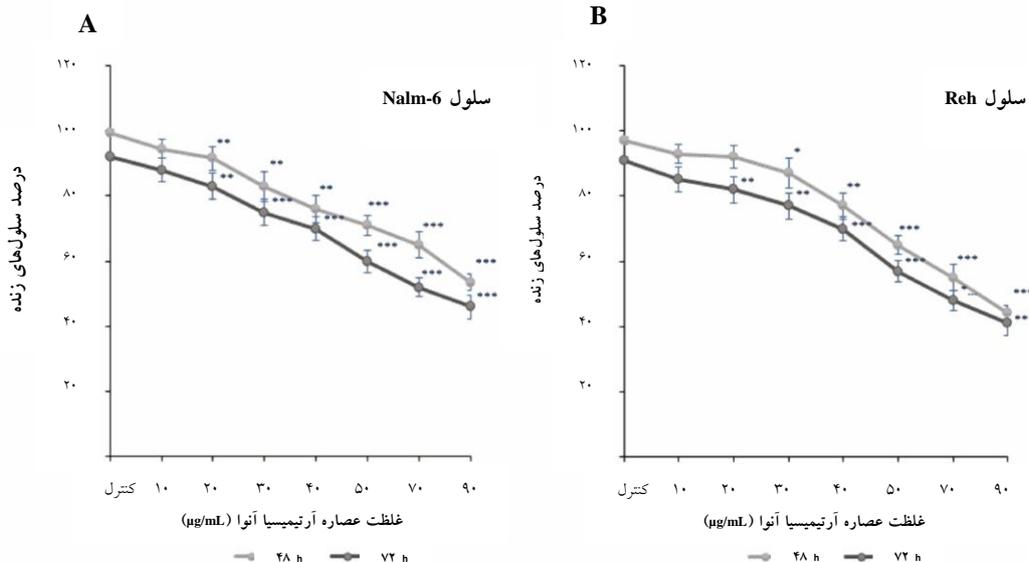
یافته‌ها

نتایج آزمون MTT:

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که آرتمیسیا آنوا رشد سلول‌های Nalm-6 و Reh را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. به طوری که بعد از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت $90 \mu\text{g/mL}$ و در تیمار ۷۲ ساعته، در غلظت $70 \mu\text{g/mL}$ ، حدوداً ۵۰٪ از سلول‌ها (IC ۵۰) در رده سلولی Nalm-6 کشته شدند، و هم چنین بعد از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت $70 \mu\text{g/mL}$ و در تیمار ۷۲ ساعته با غلظت $50 \mu\text{g/mL}$ ، حدوداً ۵۰٪ از سلول‌ها (IC50) در رده سلولی Reh کشته شدند (نمودار ۱).

آزمون بررسی فعالیت کاسپاز ۳ به منظور سنجش میزان آپوپتوز:

برای این آزمایش از کیت سنجش کلرومتریک فعالیت کاسپاز ۳ (Abcam) استفاده شد. تعداد سلول مورد نیاز برای هر غلظت طبق دستورالعمل کیت، $10^5 \times 1-5$ می‌باشد. ابتدا سلول‌های کشت داده شده با دوزهای مختلف عصاره آرتمیسیا آنوا در پلیت‌های ۱۲ خانه، تیمار شده و پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، طبق دستورالعمل کیت پروتئین‌های سلول‌ها استخراج شده و به روش BCA protein assay میزان پروتئین آن‌ها سنجیده شد. غلظت مناسب پروتئین برای هر آزمون در سنجش فعالیت کاسپاز ۳، ۵۰ الی ۲۰۰ میکروگرم به ازای هر ۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده می‌باشد. در ادامه آزمون فعالیت کاسپاز ۳ همراه با تکرار به صورت دوتایی صورت گرفت. یک چاهک به عنوان background حاوی ۵۰ میکرولیتر Reaction Buffer و در سایر چاهک‌ها، به میزان ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها اضافه شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از مخلوط 2X Reaction Buffer و DTT و سپس به میزان ۵ میکرولیتر از سوبسترا (4 mM DEVD-p-NA) به هر چاهک اضافه کرده و

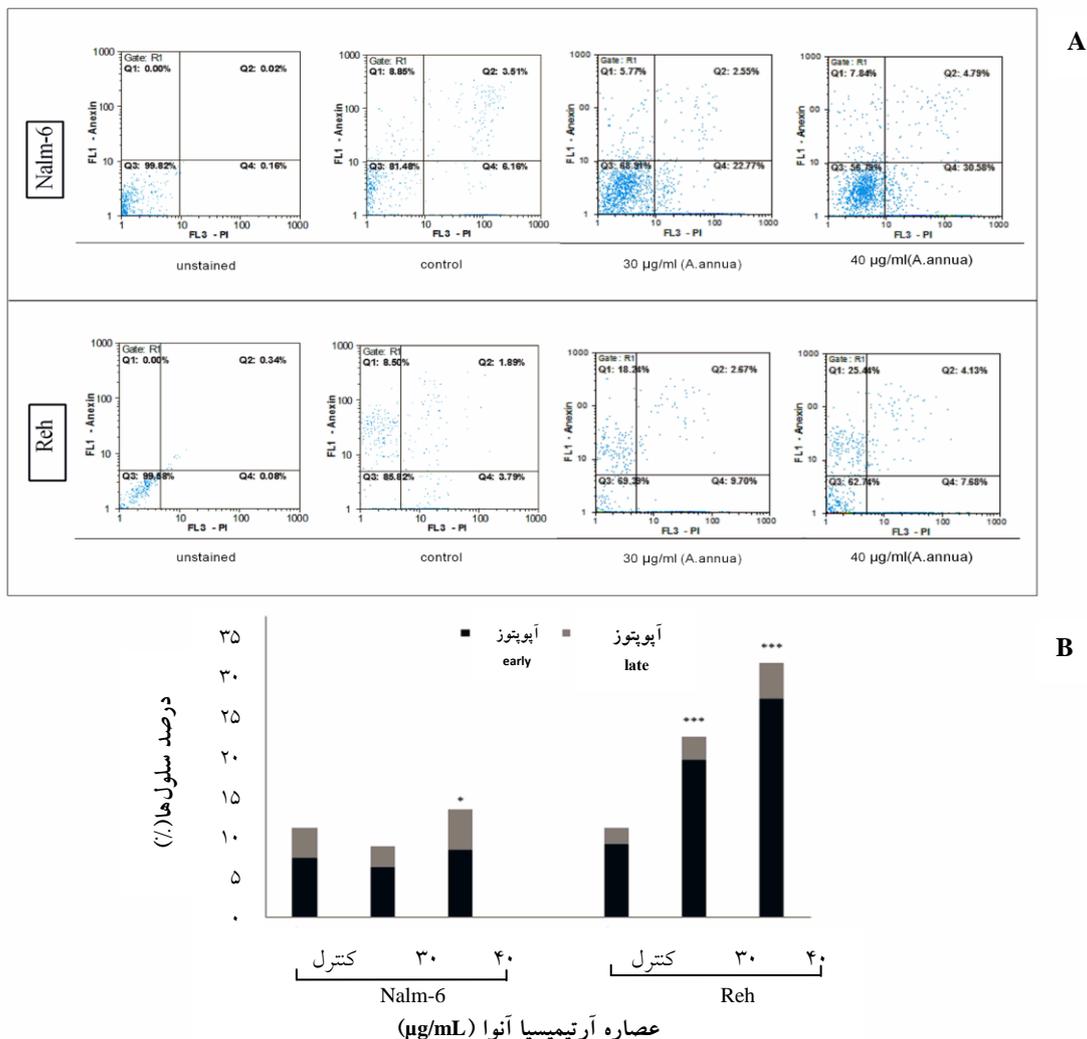


نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت در دو رده سلولی (A Nalm-6 و B Reh) ($p < 0/01$) (***) ($p < 0/01$) (*). (***) ($p < 0/05$) (*).

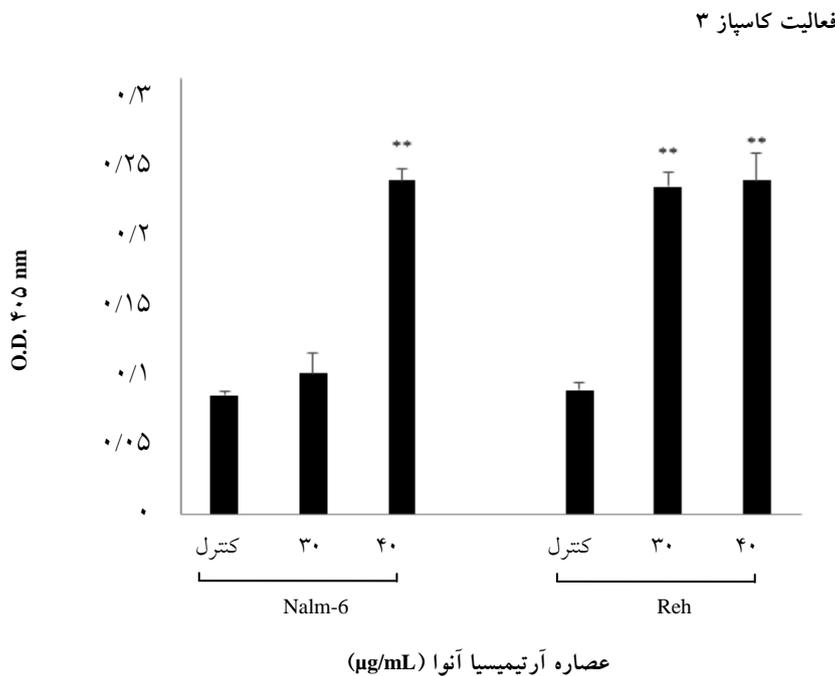
نتایج آزمون فلوسایتومتری:

با توجه به نتایج آزمون قبل، غلظت‌های $30 \mu\text{g/mL}$ و $40 \mu\text{g/mL}$ برای آزمون فلوسایتومتری انتخاب شدند. سلول‌ها طبق روشی که قبلاً بیان شد، به مدت ۴۸ ساعت با عصاره آرتیمیزیانوا تیمار شدند. نتایج حاکی از افزایش میزان آپوپتوز وابسته به غلظت نسبت به گروه کنترل بود. دوز 30 و 40 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در رده سلولی Reh سبب افزایش معنادار آپوپتوز نسبت به کنترل

شد ($p < 0/001$). در رده سلولی Nalm-6 در دوز 40 میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به کنترل افزایش معنادار یافتند ($p < 0/05$). نتایج حاصل از این آزمون در نمودار ۲ قابل مشاهده است. همان‌طور که در این نمودار نشان داده شده، درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک قابل تفکیک هستند و در رده سلولی Reh درصد سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک بالاتر از رده سلولی Nalm-6 مشاهده شد.



نمودار ۲- A): آنالیز آپوپتوز القا شده توسط رنگ‌آمیزی Annexin V-PI در رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh بعد از ۴۸ ساعت. در این گراف‌ها ربع سمت چپ پایین - سلول‌های انکسین منفی / PI منفی (سلول‌های زنده)، ربع سمت چپ بالا - سلول‌های انکسین مثبت / PI مثبت (آپوپتوز اولیه)، ربع سمت راست پایین - سلول‌های انکسین منفی / PI مثبت (سلول‌های نکروتیک) و ربع سمت راست بالا - سلول‌های انکسین مثبت / PI منفی (آپوپتوز تأخیری) می‌باشند. B) نمودار نتایج حاصل از آزمون فلوسایتومتری در دو رده سلولی Nalm-6 و Reh پس از ۴۸ ساعت ($p < 0/001$) (***) ($p < 0/05$) (*).



نمودار ۳: میزان فعالیت کاسپاز ۳ در رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh پس از تیمار ۴۸ ساعته با عصاره آرتیمیسیا آنوا ($p < 0.01$) (**)

نتایج آزمون فعالیت کاسپاز ۳:

در این آزمون، غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از سنجش کاسپاز ۳ در هر دو رده سلولی Nalm-6 و Reh، حاکی از افزایش میزان جذب نوری غلظت ۴۰ میکروگرم نسبت به گروه کنترل بود. در رده سلولی Reh غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دارای میانگین اختلاف جذب نوری قابل توجهی نسبت به گروه کنترل است و در رده سلولی Nalm-6، غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دارای میانگین اختلاف جذب نوری قابل توجهی نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($p < 0.01$) (نمودار ۳).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه، بیانگر اثر مهارى عصاره بخش‌های هوایی گیاه آرتیمیسیا آنوا بر رده‌های سلولی Nalm-6 و Reh بود، همان‌طور که در نتایج مربوط به MTT نشان داده شده است. عصاره مورد نظر در دو رده سلولی Nalm-6 و Reh از غلظت $40 \mu\text{g/mL}$ به بالا دارای اثر کشندگی قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه‌های کنترل بوده

و بیشترین اثر مهارى در تیمار ۷۲ ساعت مشاهده شد. به طوری که کاهش در سلول‌های زنده، به ویژه در غلظت‌های بالاتر مشهود است.

لوسمی لنفوبلاستیک حاد، اختلال بدخیم سلول‌های پیش‌ساز لنفوئیدی است که هم در کودکان و هم در بزرگسالان دیده می‌شود و دارای بیشترین شیوع در کودکان ۲ تا ۵ سال است. این بدخیمی به عنوان شایع‌ترین بدخیمی کودکان، به تنهایی ۷۷٪ کل لوسمی‌ها در دوران کودکی را تشکیل می‌دهد و هر ساله بیش از ۳۰٪ از سرطان‌های تشخیص داده شده در کودکان را شامل می‌شود (۲۰، ۱۹). دستورالعمل درمانی شامل روش‌های شیمی درمانی موجود است که بیش از ۸۰٪ کودکان مبتلا وارد فاز ремیشن می‌گردند اما ۲۰٪ آن‌ها به دلیل مقاومت بلاست‌های لوکمیک به درمان پاسخ نمی‌دهند (۲۱). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات طبیعی می‌توانند به طور مؤثری سبب مهار سرطان شوند (۲۲). در این مطالعه اثر مهارى عصاره آرتیمیسیا آنوا بر روی دو رده سلولی Nalm-6 و Reh مشاهده گردید. در آزمون MTT غلظت‌های بالاتر از ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بعد

حاضر غلظت ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بخش‌های هوایی آرتمیسیا آنوا منجر به افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در رده سلولی Reh شده و غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در رده سلولی Nalm-6 با افزایش قابل توجه در آپوپتوز اولیه همراه بود. در ادامه در این مطالعه فعالیت کاسپاز ۳ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده با افزایش قابل توجه فعالیت کاسپاز ۳ در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آرتمیسیا آنوا در هر دو رده سلولی همراه بود، نتایج فلوسایتومتری و فعالیت کاسپاز ۳ مطابق با نتایج به دست آمده از آزمون MTT می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار اثر عصاره متانولی بخش‌های هوایی آرتمیسیا آنوا بر روی رده‌های سلولی لنفوبلاستی Nalm-6 و Reh بررسی گردید که نتایج به دست آمده نشان داد، این عصاره دارای اثر سمیت و آپوپتوتیک بر این دو رده سلولی می‌باشد. لذا با توجه به تاثیرات فوق می‌توان این عصاره را به عنوان یک ترکیب بالقوه ضد سرطان در نظر گرفت تا با بررسی‌های بیشتری جهت شناخت ترکیبات مؤثره گیاه و مکانیسم‌های دخیل در اثرات کشندگی آن همراه با کارآزمایی‌های بالینی صورت پذیرفته، شاید عصاره حاصل از این گیاه بتواند در کنار سایر داروهای موجود در درمان این بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار اثر کشندگی و آپوپتوتیک عصاره بخش‌های هوایی گیاه آرتمیسیا آنوا بر روی رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد نشان داده شده است. عصاره آرتمیسیا آنوا را می‌توان به عنوان ماده‌ای با اثر مهاری در برابر سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد در نظر گرفت. تحقیقات گسترده‌تر جهت شناخت مکانیسم‌های آپوپتوتیک این عصاره و هم چنین شناسایی ماده مؤثره آرتمیسیا آنوا، نیاز می‌باشد.

از گذشت ۷۲ ساعت، اثر سمیت بالاتری نسبت به گروه کنترل نشان داد، که نشان می‌دهد اثر مهاری عصاره آرتمیسیا آنوا وابسته به غلظت و زمان می‌باشد و همین‌طور نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی فلوسایتومتری و فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در این مطالعه نشان داد غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این عصاره می‌تواند بعد از ۴۸ ساعت سبب افزایش قابل توجه آپوپتوز نسبت به گروه کنترل شود. مطالعه‌های قبلی نشان می‌دهد، عصاره‌های اتانولی برزیلی و چینی آرتمیسیا آنوا، دارای اثر مهاری قابل توجهی در رده سلولی Molt-4 می‌باشند (۲۳). هم چنین در مطالعه دیگری، IC50 این عصاره در یک رده سلولی سرطان پروستات (LNCaP)، ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر تخمین زده شد (۲۴). در مطالعه دیگری که گونه‌های مختلف آرتمیسیا در ایران مورد بررسی قرار گرفتند، عصاره متانولی آرتمیسیا سینفورمیس بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS)، دارای IC50 برابر با ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، هم چنین عصاره‌های دیکلومتانی آرتمیسیا دیفیوزا و آرتمیسیا سانتولینا بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT-29)، به ترتیب ۴۹ و ۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (۲۵). در مطالعه حاضر، IC50 آرتمیسیا آنوا بعد از ۴۸ ساعت در دو رده سلولی Nalm-6 و Reh، به ترتیب ۹۰ و ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. فرآیند آپوپتوز توسط عوامل آپوپتوتیک فعال شده و آنزیم کلیدی و اجرایی در این فرآیند، کاسپاز ۳ می‌باشد (۲۶). فلوسیتومتری قادر به آنالیز سریع و منحصر به فرد تعداد زیادی سلول می‌باشد که آن را برای مطالعه‌های مرگ سلولی ایده‌آل می‌نماید. رنگ‌آمیزی با Annexin V و PI (پروپیدیوم یدید) برای افتراق سلول‌ها در فازهای آپوپتوز اولیه از فاز آپوپتوز ثانویه و فاز نکروزی استفاده می‌شوند که بر پایه تعیین جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی غشای پلاسمایی به لایه خارجی آن در فاز آپوپتوز اولیه به وسیله رنگ‌آمیزی Annexin V می‌باشد (۲۷). در مطالعه

References:

- 1- Cole PD, Finkelstein Y, Stevenson KE, Blonquist TM, Vijayanathan V, Silverman LB, *et al.* Polymorphisms in genes related to oxidative stress are associated with inferior cognitive function after therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2015; 33(19): 2205-11.
- 2- Arpe ML, Rørvig S, Kok K, Mølgaard C, Frandsen TL. The association between glucocorticoid therapy and BMI z-score changes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer* 2015; 23(12): 3573-80.
- 3- Vitanza NA, Zaky W, Blum R, Meyer JA, Wang J, Bhatla T, *et al.* Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(10): 1779-85.
- 4- Abedi M, Rahgozar S, Moafi A, Ghaedi K, Moshtaghian S, Entezar-e-Ghaem M, *et al.* Evaluation of the expression profile of MDR1 gene and assessment of its prognostic value in childhood ALL. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2014; 10(4): 326-34. [Article in Farsi]
- 5- Ghaderi S, Falahati Hosein Abad A, Sarailoo MH, Ghanbari V. Investigation of the components and antibacterial effects of three plant's essential oil *Coriandrum sativum*, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens in vitro*. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2012; 14(5): 74-82. [Article in Farsi]
- 6- Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9(12): 2783-97.
- 7- Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names: Latin, English, Persian: *Farhang Mo'aser*; 1996.
- 8- Wright CW. *Artemisia*. 1st ed. London: Taylor & Francis; 2002. p. 169-70.
- 9- Lee HG, Yu KA, Oh WK, Baeg TW, Oh HC, Ahn JS, *et al.* Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J Ethnopharmacol* 2005; 98(3): 339-43.
- 10- Sharmila K, Padma P. Anticancer activity of *Artemisia vulgaris* on hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Int J Pharm Pharmaceut Sci* 2013; 5(3): 479-83.
- 11- Emami A, Rabe SZT, Ahi A, Mahmoudi M. Cytotoxic effects of *Artemisia annua* methanol extract on cancer cell lines *in vitro*. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2010; 17(3): 215-25. [Article in Farsi]
- 12- Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82(3): 349-52.
- 13- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381): 1312-6.
- 14- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 277-88.
- 15- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22(3): 355-70.
- 16- Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, *et al.* Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 2003; 4(4): 587-98.
- 17- Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997; 23(3): 525-31.
- 18- Singh J. *Maceration, Percolation and Infusion Techniques of Extraction of Medicinal and Aromatic Plants (MAPs)*. India: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants (CIMAP) Lucknow. Available on: http://www.philadelphia.edu.jo/academics/s_telfah/uploads/method%20of%20extraction.pdf.
- 19- de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 2009; 123(3): 439-45.
- 20- Atashrazm F, Zaker F, Aghaeipour M, Pazhakh V. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to childhood ALL. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2009; 6(4): 266-75. [Article in Farsi]
- 21- Felice MS, Zubizarreta PA, Alfaro EM, Sackmann-Muriel F. Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23(7): 411-5.
- 22- Won HJ, Han CH, Kim YH, Kwon HJ, Kim BW, Choi JS, *et al.* Induction of apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells by *Albizia julibrissin* extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(3): 383-9.
- 23- Singh NP, Ferreira JF, Park JS, Lai HC. Cytotoxicity of ethanolic extracts of *Artemisia annua* to Molt-4 human leukemia cells. *Planta Med* 2011; 77(16): 1788-93.
- 24- Worku N, Mossie A, Stich A, Dausgshies A, Trettner S, Hemdan NY, *et al.* Evaluation of the *in vitro* efficacy of *Artemisia annua*, *Rumex abyssinicus*, and *Catha edulis* Forsk extracts in cancer and *Trypanosoma brucei* cells. *ISRN Biochem* 2013; 2013: 910308.
- 25- Taghizadeh Rabe SZ, Mahmoudi M, Ahi A, Emami SA. Antiproliferative effects of extracts from Iranian *Artemisia* species on cancer cell lines. *Pharm Biol* 2011; 49(9): 962-9.
- 26- Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ* 2002; 9(1): 3-5.
- 27- Bertho ÁL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(3): 429-33.

Original Article

The effect of methanolic extract of aerial parts of *Artemisia annua* on proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell lines, Nalm-6 and Reh

Mashati P.¹, Esmaeili S.², Dehghan Nayeri N.¹, Darvishi M.¹, Gharehbaghian A.^{1,3}

¹School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Traditional Medicine and Materia Medica Research Center, School of Traditional Medicines, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy among children. The use of natural compounds has invoked a lot of interest in treatment of malignancies due to the adverse effects of chemotherapy treatment. *Artemisia annua* was reported to show cytotoxic effects on various cancer cell lines. In this study, cytotoxic effects of *Artemisia annua* extract were investigated on acute lymphoblastic leukemia cell lines.

Materials and Methods

In this basic research, Nalm-6 and Reh cells were cultured and then treated with various concentrations of *Artemisia annua* extract; afterwards, the cell viability was evaluated using MTT assay for 48 and 72 h. The Caspase 3 activity assay and flow cytometry following Annexin V and Propidium iodide staining were used to assess apoptosis. Statistical analysis was evaluated by one-way ANOVA test.

Results

A. annua extract showed IC₅₀ of 90 µg/ml on Nalm-6 and IC₅₀ of 70 µg/ml on Reh cells after 48 h; the cytotoxic effect after 72 h was noticeable ($p < 0.001$). Flow cytometry results also show that *A. annua* extract concentration of 40 µg/ml increases the percentage of apoptotic cells compared with control groups ($p < 0.05$). Significant increase in Caspase 3 activity was observed after treatment with *Artemisia annua* compared with control groups ($p < 0.01$).

Conclusions

Our results show that methanolic extract of aerial parts of *A. annua* exerting cytotoxic and inhibitory effects on Nalm-6 and Reh cells.

Key words: Acute Lymphoid Leukemia, *Artemisia annua*, Apoptosis

Received: 9 Nov 2016

Accepted: 3 Jan 2017

Correspondence: Gharehbaghian A., PhD in Clinical Immunohematology. School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.

P.O.Box: 15468-15514, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22731999

E-mail: gharehbaghian@sbm.ac.ir