

Original Article

Anti-cancer effects of aqueous and alcoholic licorice root extracts on human hepatocarcinoma (HepG2) cell line

Nima Rezaian Gharagozlu¹, Seyed Ataollah Sadat Shandiz², Fahimeh Baghbani-Arani^{3*}

¹MSc. Student in Genetics, Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

²Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

*Corresponding author; E-mail: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Received: 23 January 2017 Accepted: 9 March 2017 First Published online: 29 April 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July; 40(2):40-49

Abstract

Background: *Glycyrrhiza glabra* plants are known to have anti- cancer effects in traditional medicine with high antioxidant properties and few side effects. The aim of the current study was to investigate the cytotoxic activity and apoptotic effect of *Glycyrrhiza glabra* extracts toward human hepatocarcinoma (HepG2) cell line.

Methods: In this study, ethanolic and aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* was prepared. The HepG₂ and HEK293 cell lines were treated with different concentration of extracts for 24 hours. The biological activities of extracts were calculated by using colorimetric MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay. Then, the apoptotic *BAX* and anti-apoptotic *BCL2* gene expression was evaluated using real time PCR technique.

Results: The extracts have a dose-dependent toxicity effect. *BAX* and *BCL2* gene expression levels in HepG2 cells treated by ethanol extract of *Glycyrrhiza glabra* were 1.90 ± 0.01 ($P < 0.05$), and 0.64 ± 0.15 , respectively ($P > 0.05$); in HepG2 cells treated with aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra*, the *BAX* and *BCL2* gene expression levels were 1.4 ± 0.4 ($P > 0.05$), and 0.70 ± 0.5 ($P > 0.05$), respectively.

Conclusion: *Glycyrrhiza glabra* extract (especially ethanoic extract) has potential uses for treatment of liver cancer.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, *BAX*, *BCL2*, HepG₂, Apoptosis

How to cite this article: Rezaian Gharagozlu N, Sadat Shandiz S.A, Baghbani-Arani F. [Anti-cancer effects of aqueous and alcoholic licorice root extracts on human hepatocarcinoma (HepG2) cell line]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July;40(2):40-49. Persian.

مقاله پژوهشی

اثرات ضد سرطانی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه شیرین بیان
بر روی رده سلولی سرطان کبد (HepG2)نیما رضائیان قراگزلو^۱، سیدعطا اله سادات شاندیز^۲، فهیمه باغبانی آرانی^{۳*}^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران.
^۲ گروه زیست شناسی، واحد مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.^۳ گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران.
* نویسنده مسئول؛ ایمیل: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۲/۹

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۷؛ ۴۰(۲): ۴۰-۴۹

چکیده

زمینه: گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) به علت داشتن خواص آنتی اکسیدانی بالا و عوارض کم، در طب سنتی برای درمان سرطان پیشنهاد شده است. هدف از مطالعه حاضر، مقایسه سمیت سلولی و آپوپتوزی دو نوع عصاره آبی و الکلی گیاه شیرین بیان بر روی رده سلولی سرطانی کبد (HepG₂) می-باشد.

مواد و روش‌ها: عصاره‌های الکلی و آبی گیاه شیرین بیان تهیه شدند، سپس رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG₂) و نرمال HEK293 با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و فعالیت بیولوژیکی عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی MTT محاسبه شد. در نهایت، میزان بیان ژن-های آپوپتوزی BAX و BCL2 با استفاده از روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج سمیت سلولی عصاره‌های مورد مطالعه نشان داد که سمیت وابسته به دوز داشته‌اند. بیان ژن‌های BAX و BCL2 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره الکلی شیرین بیان به ترتیب به میزان 0.1 ± 0.09 ($P > 0.05$) و 0.15 ± 0.064 ($P > 0.05$) تغییر نشان داد. در حالی که بیان ژن‌های BAX و BCL2 در سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی شیرین بیان به ترتیب به میزان 0.4 ± 0.14 ($P > 0.05$) و 0.5 ± 0.07 ($P > 0.05$) تغییر یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که عصاره ریشه گیاه شیرین بیان (بوژه عصاره الکلی) می‌تواند به عنوان گیاه بومی کشورمان، پتانسیل درمان سرطان کبد را داشته باشد.

کلید واژه‌ها: گیاه شیرین بیان، BAX، BCL2، HepG2، آپوپتوز.

نحوه استناد به این مقاله: رضائیان قراگزلو، سادات شاندیز س ع، باغبانی آرانی ف. اثرات ضد سرطانی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه شیرین بیان بر روی رده سلولی سرطان کبد (HepG2). مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۴۰(۲): ۴۰-۴۹

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کارسینومای هپاتوسلولار (HCC) (Hepatocellular carcinoma) شایعترین بدخیمی اولیه کبد در جهان بوده و سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان است. گزارشات حاکی از آن است که میزان ابتلا به بیماری در بعضی کشورها مانند کشورهای اروپای مرکزی، آمریکای شمالی و اقیانوسیه به علل نامعلومی در حال افزایش است (۱). میزان بقای پنج ساله HCC در سراسر جهان کمتر از ۵٪ است و هر سال در حدود ۶۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا جان خود را از دست می‌دهند (۲). علاوه بر این، عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی تا حدود زیادی درمان را با محدودیت مواجه ساخته است. به همین دلیل نیاز به استفاده از ترکیبات طبیعی با اثرات جانبی کم و ارزان برای درمان سرطان کبد، روز به روز بیشتر احساس می‌شود (۳).

برطبق مطالعات سازمان بهداشت جهانی، گیاهان دارویی برای بدست آوردن داروهای گوناگون بهترین منبع می‌باشند و از اهمیت خاصی برخوردارند. یکی از این گیاهان دارویی که مورد مطالعه بسیاری هم قرار گرفته، گیاه شیرین بیان است. گیاه شیرین بیان با نام علمی (Glycyrrhiza glabra) گیاهی چند ساله از خانواده بقولات بوده و به واسطه دارا بودن ترکیبات دارویی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حائز اهمیت است (۴). ریشه شیرین بیان دارای ترکیبات متعددی نظیر قندهای مختلف (تا ۱۸٪)، فلاوونوئیدها، استرولها، اسیدهای آمینه، صمغ و نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها می‌باشد. عمده‌ترین ساپونین [تری ترپن ۵ حلقه‌ای] آن اسید گلیسرزیک یا C42 H62 O ۱۶ می‌باشد که از گلیسرزین، دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیستریک (آگلیکون) تشکیل شده است (۵). این ماده به عنوان مهم‌ترین ماده مؤثره ریشه شیرین بیان حدود ۵۰ مرتبه از شکر شیرین تر است (۶). از شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونت‌های تنفسی و زخم‌های پپتیک استفاده می‌شود همچنین، در درمان هپاتیت، رشد تومور و بیماری‌های قلبی کاربرد دارد (۷). در طب سنتی ایران نیز گیاه شیرین بیان به عنوان درمان ورم معده و ضدسرفه استفاده می‌شود (۸). همچنین اثبات شده است که لیکوریک یا ریشه خشک شیرین بیان اثرات افزایش ترشح سروتونین و پروستاگلاندین در معده را دارد و اثرات ضدتورم معده را از این طریق اعمال می‌نماید (۹). مطالعات نشان داده است که برخی از ترکیبات این گیاه اثرات ضدسرطانی و برخی اثرات مهار آنزیم‌ها را بر عهده دارند (۱۰).

با توجه به این که استفاده از داروهای گیاهی در کشور ما سابقه طولانی دارد، به کارگیری صحیح این داروها نسبت به داروهای شیمیایی ارجحیت دارد. بنابراین با توجه به مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که اولاً مطالعه‌ای بر روی مقایسه اثرات سمیت عصاره‌های الکلی و آبی ریشه گیاه شیرین بیان بر روی رده سلولی

سرطان کبد (HepG2) انجام نشده است. ثانياً ارزیابی بیان ژنهای آپوپتوزی دو نوع عصاره شیرین بیان در رده‌های سلولی سرطانی و نرمال با هم مقایسه نشده است. لذا ما در این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیسیته و آپوپتوزی عصاره‌های ریشه‌ی گیاه شیرین- بیان بر روی رده‌های سلولی سرطانی کبد و نرمال مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش کار

این مطالعه، آزمایشگاهی بوده و از مهر تا اسفند ماه ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. اسید گلیسرزیک با افزایش سن گیاه افزایش می‌یابد. زمان مناسب برداشت ریشه این گیاه اوایل پاییز تا اواخر زمستان می‌باشد، چرا که در این زمان، حداکثر مقدار اسید گلیسرزین در گیاه دیده می‌شود. بنابراین بعد از جمع‌آوری گیاه در اواخر پاییز از مزارع استان اصفهان و تایید نمونه گیاه توسط بخش تحقیقات شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان، عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه شیرین بیان توسط کارشناس شرکت تهیه گردید. روش تهیه عصاره ریشه شیرین بیان به شرح ذیل بود. ابتدا ریشه گیاه به خوبی شسته و خشک گردید. سپس ریشه آسیاب گردید و ۱۰۰ گرم پودر حاصل با یک لیتر اتانول ۷۰ درصد (مجللی، ایران) در پرکولاتور (پکو، ایران) مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس عصاره حاصل از مخلوط جداسازی شد و اتانول موجود در عصاره، تحت شرایط خلاء تا حد امکان جداسازی شد و در دمای محیط خشک گردید. برای تهیه عصاره آبی به ازای هر گرم پودر، حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بشر ریخته و پس از جوش آمدن آب مقطر به آن پودر گیاه را اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده گردید (۱۱). سپس مایع حاصله توسط قیف بوخنر و با استفاده از کاغذ صافی (Whatman، انگلستان) معمولی صاف شده و به دستگاه حذف حلال (مدل EW2870501 ساخت شرکت Heidolf، آمریکا) منتقل شد. آنگاه بقیه آن در حمام آب گرم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت عمل حذف قرار گرفت. عصاره‌های خشک تا زمان استفاده در یخچال (Bosch، آلمان) نگهداری شدند. در نهایت برای انجام تست‌های بعدی محلول‌های بدست آمده در غلظت-های مختلف تهیه و با فیلتر سرسرنگی ۲۰۰ نانومتر فیلتر شدند (۱۲).

به منظور کشت سلولی، رده‌های سلولی سرطان کبد HepG2 و نرمال HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Biosera, USA) غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco, Scotland)، پنی-سیلین (۱۰۰ میکرونیوت در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰

۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۱۵). در این مطالعه پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های BAX و BCL2 به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) مورد انتخاب قرار گرفتند. بعد از سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های BAX و BCL2 از پرایمرهای اختصاصی با توالی‌های جلوبر ۵'-
3'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG و برگشتی ۵'-
3'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC و ژن BAX و توالی‌های ۵'-
3'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC و برگشتی ۵'-
3'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG به ترتیب جلوبر و برگشتی BCL2 استفاده شد. همچنین از ژن مرجع GAPDH با توالی پرایمری ۵'-
3'-CAGCCACACTGTCCCCATCTA و برگشتی ۵'-
3'-AGCAAGGTCGAGACGAAG استفاده شد. در نهایت، برای بررسی بیان ژن‌ها از روش Real Time PCR استفاده شد.

به منظور درستی توالی و اطمینان از عدم اتصال غیر اختصاصی پرایمرها به بخش‌های دیگر ژنوم، از ابزار BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) استفاده شد. در این تحقیق، برنامه زمانی-گرمایی دستگاه Real Time PCR به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی و مرحله پایانی برای رسم منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. حجم نهایی واکنش‌های Real-Time PCR، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که در پلیت‌های ۹۶ خانه و به صورت تکرار سه تایی انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی واکنش PCR حاوی سایبرگرین (SYBER-Green PCR Master Mix)، پنج میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم)، یک میکرولیتر (۴۰۰ نانو مولار) از آغازگرهای جلویی و برگشتی اختصاصی هر ژن، و مابقی آب مقطر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. در این تحقیق، تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق مقایسه چرخه آستانه انجام شد. اختلاف چرخه آستانه به دست آمده از سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ها و سلول‌های تیمار نشده با عصاره‌ها محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مطابق با فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت (۱۵).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شدند و تحت شرایط دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (۱۳). به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره‌های ریشه گیاه از تست رنگ سنجی MTT (۳-(۴,۵-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاه شیرین بیان در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی HepG2 و نرمال HEK293 تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Sigma Aldrich، آلمان) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ نگه داشته شدند. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در دی-متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA reader, Oraganon, Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

تست‌های این آزمون با حداقل سه بار تکرار انجام شد. همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (IC_{50} یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد (۱۴).

میزان بیان ژن‌های پروآپتوزی BAX و ضد آپتوزی BCL2 با استفاده از روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا کل RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH، آلمان) سنجیده شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل (cDNA) بر طبق دستورالعمل کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase, USA) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۲۰ میکرولیتر که شامل یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، پنج میکرولیتر بافر واکنش ۵x، دو میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. تکثیر ژن‌های موردنظر با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت که طبق برنامه دمایی-زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و

نرمال HEK293 تیمار شده با عصاره آبی و الکلی شیرین بیان به ترتیب $734/49 \mu\text{g/ml}$ و $675/97 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

در مجموع نتایج نشان دهنده تفاوت پاسخ دو رده سلولی به عصاره‌های آبی و الکلی گیاه شیرین بیان دارد. تغییر در بیان ژنهای پروآپتوزی BAX و ضد آپتوزی BCL2 در سلول‌های HepG2 تیمار شده با غلظت IC_{50} عصاره‌های آبی و اتانولی شیرین بیان با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی و عدم جفت شدن آغازگرها برای هر دو ژن آپتوزی و کنترل داخلی از طریق منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۳). نسبت بیان ژنهای BAX و BCL2 به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی HepG2 تیمار شده با عصاره الکلی شیرین بیان به ترتیب به میزان $(P > 0/05)$ $1/9 \pm 0/1$ و $(P > 0/05)$ $0/64 \pm 0/15$ می باشد.

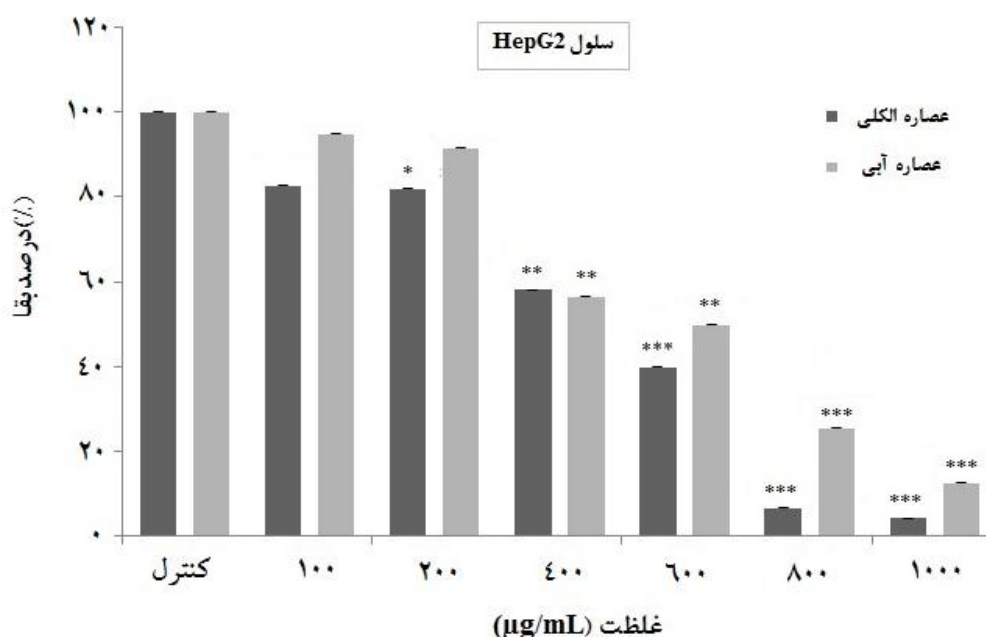
به عبارتی در ژن BAX افزایش و در BCL2 کاهش بیان دیده می شود. در رده سلولی سرطانی HepG2 تیمار شده با عصاره آبی شیرین بیان نسبت بیان ژنهای BAX و BCL2 به ژن مرجع به میزان $(P > 0/05)$ $1/4 \pm 0/4$ افزایش و $(P > 0/05)$ $0/70 \pm 0/15$ کاهش داشت (نمودار ۴).

تمامی نتایج بدست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه تکرار استوار می باشد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه P value با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت. همچنین، مقدار $P < 0/05$ در هر تست معنی دار در نظر گرفته شد.

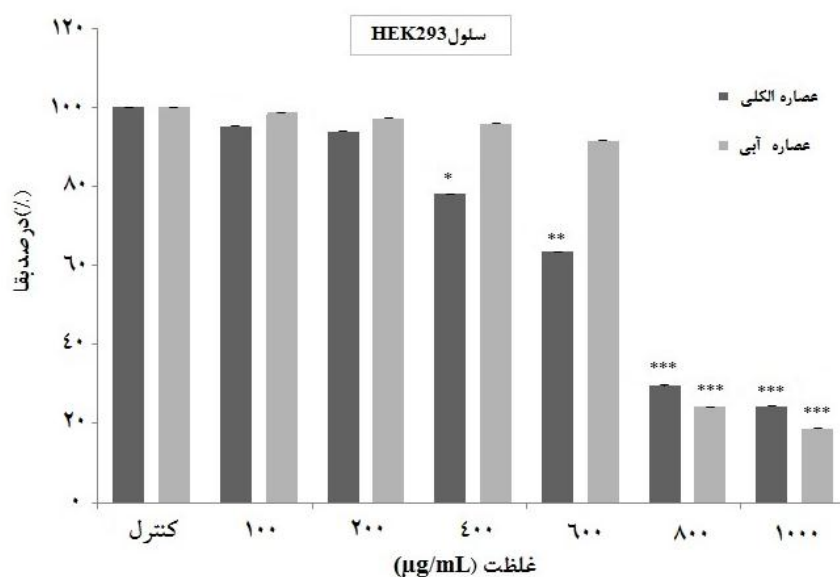
یافته‌ها

تیمار سلول‌های HepG2 و HEK293 با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) از عصاره‌های آبی و الکلی با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت میزان درصد بقای سلول‌های تحت تیمار عصاره آبی و الکلی در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است.

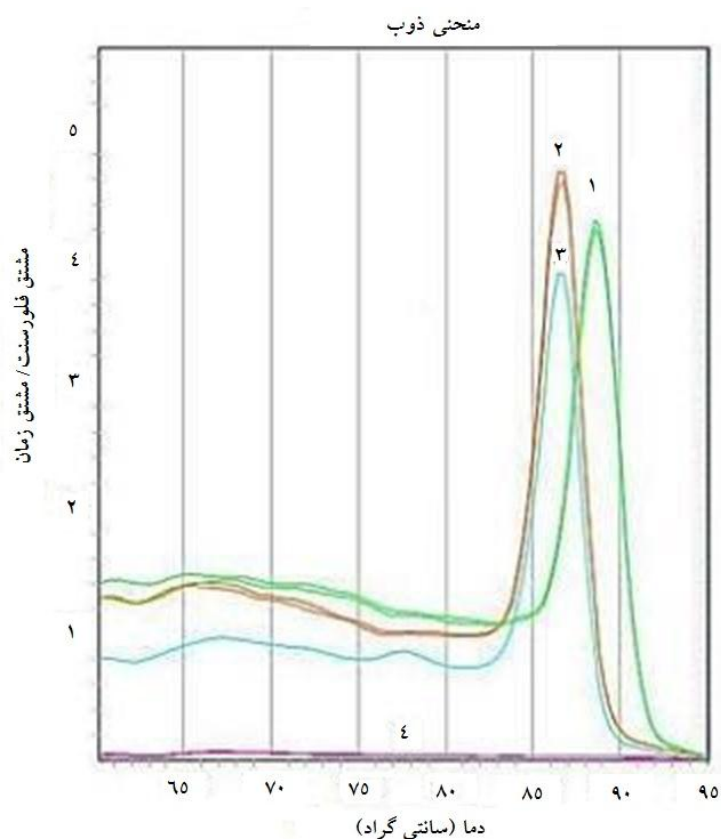
همچنین میزان IC_{50} برای عصاره‌های آبی و اتانولی در زمان ۲۴ ساعت در رده سلولی سرطانی HepG2 و نرمال HEK293 محاسبه شد. میزان IC_{50} در رده سلولی HepG2 تیمار شده با عصاره آبی و الکلی شیرین بیان به ترتیب $567/92 \mu\text{g/ml}$ و $476/28 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. در حالی که این میزان در رده سلولی



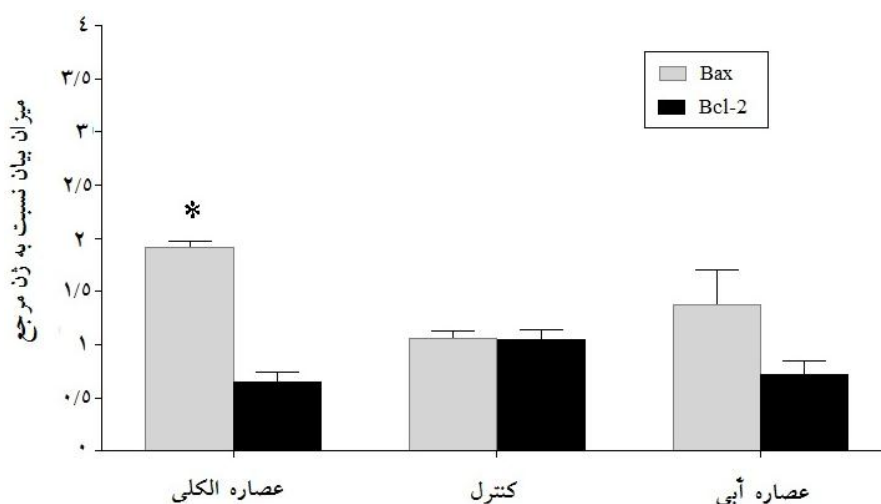
نمودار ۱: محاسبه درصد بقای سلول‌های HepG2 با غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی شیرین بیان در مدت زمان ۲۴ ساعت، نتایج به صورت درصد بقا گزارش شده است ($P < 0/05$ ***, $P < 0/01$ **, $P < 0/001$ ***). (n=3)



نمودار ۲: محاسبه درصد بقای سلول‌های HEK293 با غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی و آبی شیرین بیان در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا گزارش شده است (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; $n=3$).



نمودار ۳: منحنی ذوب ژن‌های (۱) BAX، (۲) BCL2 و (۳) GAPDH که محور عمودی نشان دهنده مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده درجه سانتی‌گراد، الگوی منحنی ذوب ژن GAPDH ۸۲/۹۱ درجه سانتی‌گراد و منحنی ذوب ژن BAX در دمای ۸۴/۸۱ سانتی‌گراد نشان داده شده است. منحنی ذوب ژن BCL2 در دمای ۸۲/۶۴ سانتی‌گراد نشان داده شده است. NTC (Non Template Control) (۴): نمونه کنترل بدون الگو می‌باشد. در این واکنش علامت فلورسنت به صورت خطی است که بیانگر عدم جفت شدن آغازگرها و فقدان باند غیر اختصاصی است.



نمونه ها

نمودار ۴: نمودار میزان بیان ژنهای BAX و BCL2، به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی HepG2 تیمار شده با عصاره آبی و الکلی ریشه شیرین بیان طی ۲۴ ساعت. (P<۰/۰۵:*)، (P<۰/۰۱)**، (P<۰/۰۰۱)***.

بحث

گرفته فعالیت ضد باکتریایی و اثرات ضد ویروسی شیرین بیان نیز مشخص شده است (۲۴و۲۵). با توجه به مطالعات ذکر شده و لزوم بررسی های بیشتر بویژه در ارتباط با مقایسه اثرات سمیت دو نوع عصاره ی اتانولی و آبی شیرین بیان گونه بومی ایران مطالعه حاضر طراحی گردید. همچنین در این مطالعه علاوه تعیین بر میزان سمیت با بررسی ژنهای آپاپتوتیک اطلاعاتی از نوع مرگ احتمالی سلول ها نیز فراهم گردیده است. لذا پژوهش حاضر در نوع خود یک مطالعه جدید می باشد.

در این مطالعه مقدار IC_{50} محاسبه شده برای عصاره اتانولی شیرین بیان ۴۷۶/۲۸ میکروگرم در میلی لیتر علیه رده سلولی سرطانی HepG2 در مقایسه با عصاره آبی محاسبه شد که نشان دهنده قدرت کشندگی بالای این عصاره دارد این نتیجه در تایید مطالعه انجام گرفته توسط Basar و همکاران است به طوریکه آنها نشان دادند اثر سمیت سلولی عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین بیان جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف بر روی رده های سرطان ریه (A549) و کبد (HepG2) قابل توجه می باشد (۱۹).

همچنین عصاره شیرین بیان در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را در مورد عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی نشان داد که از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل معنی دار است. در حالی که غلظت های ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری در هیچ کدام از عصاره ها نشان نداد. در مجموع این نتایج نشان می دهد که میزان اثر کشندگی سلول ها توسط عصاره آبی و الکلی گیاه شیرین بیان، بستگی به غلظت عصاره ها دارد.

گسترده گی شیوع سرطان در طول سال های گذشته موجب پیشرفت در روش های درمانی گوناگونی شده است که بسته به وسعت بیماری، میزان پیشرفت، موقعیت، نوع و وضعیت بیمار ترکیبی از روش های مختلف جهت مبارزه با سرطان مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶) در این میان، سرطان کبد، سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان است و جزء سرطان های با سرعت کشندگی بالا به شمار می رود. از آنجایی که راهکار درمانی مطمئنی وجود ندارد، یافتن راهبردهای موثر و جدید و در درمان این سرطان ضرورت پیدا می کند (۱۷).

خاصیت ضد سرطانی و برخی دیگر از خواص عصاره های گیاهی از چندین سال قبل شناخته شده است و بازگشت مجدد به فرآورده های طبیعی همچون گیاهان دارویی می تواند رویکرد مثبتی در کنترل و درمان طیف وسیعی از بیماری ها از جمله سرطان باشد (۱۸). به طوریکه مطالعات مختلفی بر روی اثرات سمیت سلولی عصاره گیاهان بر روی رده های سلولی سرطانی صورت پذیرفته است (۱۹-۲۳). برای مثال Kannappan و همکاران، اثرات حفاظتی عصاره گیاه شیرین بیان بر سیستم عصبی در سطح سلولی مولکولی را مورد تایید قرار دادند (۲۰). همچنین در بررسی انجام شده توسط Chien و همکاران به وسیله جداسازی Glycyrrhizin توسط کروماتوگرافی و تجزیه و تحلیل زیست شناختی دارویی آن معلوم گشت که این ماده دارای خواص ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد التهاب، محافظت سلول های کبدی از سیروز می باشد (۲۱). همچنین اثرات عصاره ریشه شیرین بیان در درمان چربی خون (۲۲) و اثر ضد توموری آن روی رده سلولی کبدی HepG2 (۲۳) نیز نشان داده شده است. در دیگر مطالعات انجام

مشخص شده و به عنوان یک ترکیب ضدسرطانی امید بخش به مراکز دارویی بکار گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار به تفاوت اثرات سایتوتوکسیتی عصاره هیدروالکلی و آبی ریشه گیاه شیرین بیان بومی ایران بر رده سلولی سرطانی کبد پرداخته شد و مشاهده شد که اثرات عصاره الکلی نسبت به عصاره‌ی آبی، در افزایش بیان ژن پروآپتوتیک BAX و کاهش بیان ژن BCL2 در سلول‌های سرطانی کبد و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بیشتر است. بنابراین با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی سرطان، می‌توان این دسته از گیاهان دارویی بومی را مورد بررسی‌های بیشتری قرار داد و پس از تایید کارایی آنها در محیط آزمایشگاهی، اثر ضد سرطانی آنها را در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی و بررسی قرار داد.

قدردانی

مقاله حاضر استنتاج شده از داده‌های پایان نامه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین با شماره ۱۴۳۳۰۵۰۳۹۴۲۰۲۸ می‌باشد. در ضمن از تلاش کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک بخصوص جناب آقای دکتر عسگری و خانم بیگدلی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، به علت عدم استفاده از نمونه‌های انسانی، ملاحظه اخلاقی وجود نداشت.

منابع مالی

حمایت مالی از این مطالعه تحقیقاتی توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام گرفت.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ن ر ق و ع، سادات س ع س ش و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همکاران نگارش مقاله را بر عهده داشتند، نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید نموده‌اند.

در این مطالعه، جهت ارزیابی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی القا شده توسط عصاره‌های هیدروالکلی و آبی، از غلظت‌های IC₅₀ عصاره‌ها علیه سلول‌های سرطانی و نرمال به روش Real Time PCR استفاده شد. به طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. بنابراین بیشتر مطالعات سالهای اخیر در جهت یافتن داروهای ضد سرطانی می‌باشد که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کند تا بدون ایجاد التهاب سلول سرطانی فاگوسیت شده و در نهایت از بین برود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میتوکندری توسط پروتئین‌های Bax و Bak شروع شده و موجب آزاد سازی سیتوکروم c از بین دو غشا میتوکندری و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود (۲۶). علاوه بر این پروتئین‌های Bcl2 و Bclxl با قرار گرفتن در سطح شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری و هسته از کنار هم قرار گرفتن پروتئین‌های Bax و Bak جلوگیری کرده و فعالیت ضد آپوپتوزی نشان می‌دهند (۲۷).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که اثر عصاره الکلی شیرین بیان بعد از ۲۴ ساعت، نسبت به عصاره آبی بیشتر بوده و می‌تواند سبب بیان بالای ژن پروآپتوزی BAX و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی BCL2 در سلول سرطانی شود و نسبت BAX/BCL2 را بیشتر افزایش می‌دهد. در تحقیق دیگری نیز نشان داده شد که عصاره شیرین بیان موجب افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن BCL2 به میزان چشمگیری در سلول‌های MKN-28 و به طور متوسطی در سلول‌های سرطان معده AGS می‌شود. افزایش نسبت BAX/BCL2 منجر به تحریک آزاد شدن سیتوکروم c از فضای بین دو غشاء میتوکندری به سیتوزول می‌شود که این پدیده سبب فعال شدن کاسپاز اجرایی ۳ و القا آپوپتوز می‌شود (۲۸). نتایج تحقیق حاضر اثرات کشندگی دو نوع عصاره‌ی آبی و الکلی ریشه شیرین بیان را به خوبی نشان داد. با توجه به تاثیر بیشتر عصاره الکلی، شاید بتوان از آن به عنوان ترکیب موثر علیه سلول‌های سرطان کبد استفاده نمود. چنین یافته‌ای را با توجه به این نکته می‌توان توجیح نمود که هر کدام از عصاره‌ها به علت داشتن ترکیبات فعال زیستی، و نوع اثر حلال در آزاد سازی ترکیبات زیستی گیاه، مسیرهای مختلفی را برای جلوگیری از رشد سلول‌ها بکار برده و دارای اثرات متفاوتی روی رده سرطانی HepG2 هستند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی ترکیبات شناسایی شده انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این گیاه بیشتر

References

- Kim JU, Shariff MIF, Crossey MME, Gomez-Romero M, Holmes E, Cox IJ, et al. Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers. *World J Hepatol* 2016; 8(10): 471-484. doi: 10.4254/wjh.v8.i10.471.

2. Shaker MK, Abdella HM, Khalifa MO, El Dorry A. Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma in Egypt: a retrospective analysis of 1313 case. *Liver Int* 2013; **10**: 1601-1606. doi: 10.1111/liv.12209.
3. Shabkhiz MA, Eikani MH, Bashiri Sadr Z, Golmohammad F. Super-heated water extraction of glycyrrhizin acid from licorice root. *Food Chem* 2016; **210**(1): 396-401. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.006.
4. Khanahmadi MM, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi – Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, et al . A Review on Medicinal Plant of *Glycyrrhiza glabra* L. *JMP* 2013; **2** (46): 1-12. [Persian].
5. Nezamabadi H, Rahimiyan Mashhadi H, Zand A, Alizadeh H. Investigation of some eco physiological aspects of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) rhizome. *Applied Entomology & Phytopathology* 2007; **74**(2): 45-62. [Persian].
6. Karaogul E, Parlar P, Parlar H, Alma M.H. Enrichment of the glycyrrhizin acid from Licorice Roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) by Isoelectric Focused Adsorptive Bubble Chromatography. *J Analyt Methods in Chem* 2016; **2016**(2016): Article ID 7201740, 5 pages. doi: 10.1155/2016/7201740.
7. Cheel J, Tumova L, Areche C, Pierre VA , Neve J, Zouaoui-Boudjeltia K. Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvest times. *Acta Physiol Plantarum* 2013; **35**(4): 1337-1349. doi: 10.1007/s11738-012-1174-9.
8. Cheel J, Van Antwerpen P, Tumorová L, Onofre G, Vokurková D, Zouaoui-Boudjeltia K. Free radical scavenging, antioxidant and immune stimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Food Chem* 2010; **122**: 508-517. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.060.
9. Mahima Rahal A, Deb R, Latheef SK, Samad HA, Tiwari R, Verma AK, et al. Immunomodulatory and Therapeutic Potentials of Herbal, Traditional/Indigenous and Ethnoveterinary Medicines. *Pakistan J Biolog Sci* 2012; **15**: 754-774. doi: 10.3923/pjbs.2012.754.774.
10. Li YJ, Chen J, Li Y, Li Q, Zheng YF, Fu Y, et al. Screening and characterization of natural antioxidants in four Glycyrrhizin species by liquid chromatography occupied with electrospray ionization quadrupole time of flight tanned mass spectrometry. *J Chromatogram* 2011; **1218**(45): 8181-8191. doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.030.
11. Avijgan M, Mahboubi M, Moheb Nasab M, Ahmadi Nia E, Yousefi H. Synergistic activity between *Echinophora platyloba* DC ethanoic extract and azole drugs against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering chronic recurrent vaginitis. *J Myco Méd* 2014; **24**(2): 112-116. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.116.
12. Soltani N, Karami R, Ranjbar M. The interaction of salicylic acid and cold stress on antioxidant enzyme activities in licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *J Herbal Drugs* 2011; **2**(1): 7-13. [Persian].
13. Mohammad Saleem MMN, Mohammad AAW, Al-Tameemi JA, Ghassan MS. Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice. *AJB* 2011; **10**(59): 12702-12706. doi: 10.5897/AJB11.1399.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
15. Shandiz SAS, Farasati S, Saeedi B, Baghbani-Arani F, Akbari Asl E, Keshavarz-Pakseresht B, et al. Up regulation of *KAI1* gene expression and apoptosis effect of imatinib mesylate in gastric adenocarcinoma (AGS) cell line. *Asian Pac J Trop Dis* 2016; **6**(2): 120-125. doi: 10.1016/S2222-1808(15)60996-3.
16. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine* 2014; **10**: 19-34. doi: 10.1016/j.nano.2013.07.001.
17. Abolaji AO, Eteng MU, Ebong PE, Dar A, Farombi EO, Choudhary MI. *Artemisia annua* as a possible contraceptive agent: a clue from mammalian rat model. *Nat Pro Res* 2014; **28**: 2342-2346. doi: 10.1080/14786419.2014.936016.
18. Zaidi SH, Huddart RA, Harrington KJ. Novel targeted radio sensitizers in cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 2009; **6**(2): 103-134. doi: 10.2174/157016309788488348.
19. Basar N, Oridupa OA, Ritchie KJ, Nahar L, Osman NM, Stafford A, et al. Comparative cytotoxicity of *Glycyrrhiza glabra* Roots from Different Geographical Origins Against Immortal Human Keratinocyte (HaCaT), Lung Adenocarcinoma (A549) and Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *Phyto ther Res* 2015; **29**(6): 944-948. doi: 10.1002/ptr.5329.
20. Kannappan R, Gupta SC, Kim JH, Reuter S, Aggarwal BB. Neuroprotection by spice-derived nutraceuticals: you are what you eat! *Mol Neurobiol* 2011; **44**(2): 142-159. doi: 10.1007/s12035-011-8168-2.
21. Chien CF, Wu YT, Tsai TH. Biological analysis of herbal medicines used for the treatment of liver diseases. *Biomed Chromatography* 2011; **25**(1-2): 21-38. doi: 10.1002/bmc.1568.
22. Hasani-Ranjbar S, Nayeibi N, Moradi L, Mehri A, Larijani B, Abdollahi M. The efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of hyperlipidemia: a systematic review. *Curr pharma Design* 2010; **16**(26): 2935-2947. doi: 10.2174/138161210793176464.
23. Ferraz RP, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MB, DaSilva TB, Machado WJ. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) *Phytomed* 2013; **20**(7): 615-621. doi: 10.1016/j.phymed.2013.01.015.
24. Messier C, Epifano F, Genovese S, Grenier D. Licorice and its potential beneficial effects in common oro-dental

- diseases. *Oral Diseases* 2012; **18**(1): 32-39. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01842.x.
25. Yasui S, Fujiwara K, Tawada A, Fukuda Y, Nakano M, Yokosuka O. Efficacy of intravenous glycyrrhizin in the early stage of acute onset autoimmune hepatitis. *Digest Dis Sci* 2011; **56**(12): 3638-3647. doi: 10.1007/s10620-011-1789-5.
26. Leyden JJ, Shergill B, Micali G, Downie J, Wallo W. Natural options for the management of hyperpigmentation. *J European Academy of Dermatol Venereol* 2011; **25**(10): 1140-1145. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04130.x.
27. Xiao XY, Hao M, Yang XY, Ba Q, Li M, Ni SJ, et al. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Lett* 2011; **302**(1): 69-75. doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.016.
28. Del Poeta G, Bruno A, Del Principe MI, Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; **8**(3): 207-222. doi: 10.2174/156800908784293640.