مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر بیان ژن اورنیتین دکربوکسیلاز-۱ (ODC1) و تکثیر سلولی در رده‌های سلولی سرطان سینه انسان

اکبر صفی‌پور افشار .Ph.D *، فاطمه سعید نعمت پور .Ph.D، متینه لکزیان .MSc. Student

- گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

چکیده

هدف: محصول ژن اورنیتین دکربوکسیلاز-۱ (ODC1) آنزیم کلیدی دخیل در سنتز پلی‌آمین‌ها است که در انواع سرطان میزان آن‌ها افزایش می‌یابد. در این پژوهش اثر عصاره ریشه گیاه شیرین‌بیان بر بیان ژن ODC1 و درصد زنده‌مانی در دو رده سلولی سرطانی (MCF-7, MDA-MB-231) و رده نرمال (MCF-10A) سلول‌های پستانی انسان بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: رده‌های سلولی تحت تاثیر غلظت‌های افزایشی عصاره از صفر تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند. فعالیت سایتوتوکسیک عصاره با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. بررسی کمی بیان ژن ODC1 با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام شد.

نتایج: با افزایش غلظت عصاره میزان مرگ و میر سلول‌ها به‌ویژه در دو رده سرطانی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین با افزایش غلظت عصاره بیان ژن ODC1 در رده‌های سرطانی کاهش قابل توجهی پیدا کرد و در مقایسه دو رده سرطانی رده MDA-MB-231 بیشتر تحت تاثیر عصاره گیاه شیرین بیان قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حاکی از اثر بالقوه عصاره گیاه شیرین‌بیان بر بیان ژن ODC1 در سلول‌های سرطانی پستان انسان و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی است.

واژگان کلیدی: ODC1، ضد سرطان، شیرین‌بیان، سایتوتوکسیک

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین دلایل مرگ در جهان است. اکثر مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان مربوط به سرطان پستان است (۱ و ۲). سرطان سینه دومین عامل مرگ بعد از سرطان ریه است. این سرطان ۳۲ درصد کل سرطان‌های زنان را شامل می‌شود و احتمال ابتلای یک خانم در طول ۹۰ سال زندگی ۱ به ۸ است (۳). بنابراین تحقیقات گسترده‌ای جهت شناسایی ژن‌های دخیل در سرطان پستان انجام‌شده است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ژن Ornithine Decarboxylase (ODC) است. محصول آنزیمی این ژن در کاتالیز اورنیتین به پوترسین نقش دارد که از واکنش‌های دخیل در سنتز پلی‌آمین‌ها است (۴). پلی‌آمین‌ها برای پایدار نگه‌داشتن ساختار DNAو ترمیم شکستگی‌ها در آن ضروری می‌باشند (۵). بنابراین این آنزیم برای رشد سلول، پایداری DNA تازه سنتز شده لازم است و نقص یا عدم وجود این آنزیم باعث القای آسیب DNA و تولید سلول سرطانی می‌شود. از طرف دیگر افزایش بیان ODC نیز باعث افزایش میزان سرطان‌زایی می‌شود چون ODC هدف آنکوژن myc است به‌طوری‌که در انواع سرطان میزان بیان آن افزایش می‌یابد (۶). آزمایش‌های گوناگونی نشان داده است که میزان بیان این ژن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های عادی پستانی افزایش چشمگیری داشته است (۷-۹). ازاین‌رو استفاده از روشی که منجر به کاهش بیان ژن ODC و فعالیت آنزیمی آن بشود می‌تواند راه‌حل موثری در درمان سرطان پستان باشد.

استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان داروی ضد سرطان به‌دلیل عدم وجود عوارض جانبی، در پیشگیری و درمان این بیماری موثر است (۱۰, ۱۱). گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* دارای ریشه‌ای با خواص دارویی است. ریشه این گیاه حاوی ترکیباتی چون گلیسیریزین، فلاونوئید، ایزوفلاونوئید و فیتواستروژن است. برخی از ترکیبات این گیاه اثرات ضد سرطانی و برخی اثرات مهار آنزیم‌ها را بر عهده دارند (۱۲). وجود ترکیبات کاهش‌دهنده چربی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی‌اکسیدانت قوی در این گیاه گزارش‌شده است (۱۰). همچنین اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه شیرین‌بیان بررسی‌شده و نتایج نشان داده است که در مقایسه با داروهای استروئیدی و غیراستروئیدی، عصاره این گیاه سمیت سلولی کمتری دارد (۱۳). بنابراین در این مطالعه ضمن بررسی اثر سمیت سلولی عصاره ریشه گیاه شیرین‌بیان بر دو رده سلولی سرطانی (MCF-7, MDA-MB-231) و رده نرمال (MCF-10A) سلول‌های پستانی انسان، سطح بیان ژن ODC نیز ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل مورد استفاده: مواد شیمیایی مورداستفاده از شرکت‌های Sigma (USA) و Merk (Germany) تهیه شد. مواد و آنزیم‌های کاربردی در بیولوژی مولکولی از سینا ژن (ایران) و ABI (USA)، همچنین کیت‌ها و مواد مورداستفاده در RT-PCR از شرکت فرمنتاز (Fermentas) تهیه شد.

تهیه عصاره گیاهی: جهت تهیه عصاره آبی از ریشه گیاه شیرین‌بیان استفاده شد که از شهر نیشابور واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری‌شد. گونه گیاهی شیرین بیان توسط آقای طاهری شناسایی و کد هرباریومی (۱۰۳۵) در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور به آن اطلاق شد. بدین‌منظور ۵۰ گرم از ریشه درون پارچه تنظیف و در محفظه دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره گیری به‌مدت ۴ ساعت ادامه یافت به‌طوری‌که رنگ عصاره به قهوه‌ای تیره تغییر یافت. سپس حذف آب عصاره‌ها به‌وسیله دستگاه روتاری تا حد ممکن انجام شد. عصاره‌های غلیظ در درون ظروف درباز در محیط آزمایشگاه جهت تبخیر آب باقی‌مانده قرار داده شدند. در پایان عصاره‌های خشک جمع‌آوری و جهت تهیه غلظت‌های موردنظر به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

در این پـژوهش از غلظـت‌هـای صـفر، ۱۰۰، ۵۰،۲۰، ۱۰و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ها استفاده شد. جهـت تهیه این غلظت‌ها ابتدا یـک اسـتوک ۱۰۰ میلـی‌گـرم در میلی‌لیتـر از عصـاره خشـک تهیـه و بـرای سـاخت سـایر غلظت‌هـا اسـتفاده شـد. بـرای غلظـت صـفر از آب مقطـر دیونیزه استفاده شد.

رده‌های سـلولی و محـیط کشـت: در ایـن تحقیـق از رده‌های سلولی سـرطان پسـتانMCF-7 وMDA-MB-231 و رده سـلولی نرمـال MCF-10A اسـتفاده شـد. سلول‌های MCF-7 از آزمایشگاه کشـت سـلول دانشـکده علوم دانشگاه فردوسی تهیـه شـد و دو رده دیگـر از بانـک سلولی انستیتو پاسـتور ایـران (تهـران) خریـداری شـدند. سلول‌ها در فلاکس ۲۵ سانتی‌متر مربع به‌همراه ۱۰ درصد FBS (سرم جنینی گاوی)، در دمای۳۷ درجه سانتی‌گـراد با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبـت کشـت داده شـدند. محیط کشت روزانه تعویض شده و هـر ۳ تـا ۴ روز پاسـاژ داده شدند.

سنجش سـمیت سـلولی: فعالیـت سایتوتوکسیسـیتی عصـاره بـا اسـتفاده از سـنجش MTT (bromide 2,3,5diphenil tetrazolium) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش MTT به نمونه‌ها اضافه شده و توسـط یـک آنزیم میتوکندریایی شکسته مـی‌شـود و تولیـد فورمـازون نامحلول کرده که قابل‌اندازه‌گیری اسـت و بـه ایـن شـیوه می‌توان تعداد سلول زنده در نمونه را تعیـین کـرد. بـدین منظور نمونـه‌هـایی بـا تـراکم۳۰۰۰ سـلول در پلیـت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمـای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس غلظـت‌هـای مختلـف عصاره به سلول‌هـا اضـافه و بـه‌مـدت ۴۸،۲۴ و۷۲ سـاعت انکوبه گردید. بعد از این مدت مقدار ۲ میلی مولار محلول MTT به هر خانه اضافه‌شده و بـه‌مـدت ۴ سـاعت انکوبـه شـد. سـپس۱۰۰ میلـی‌لیتـر DMSO (dimethyl sulfoxide) اضـافه و بـه‌مـدت ۱۰ دقیقـه هـم زده شـد. نهایتـا جـذب در طـول مـوج ۵۴۰ نـانومتر بـا اسـتفاده از دسـتگاه (Awareness, Palm City, FL, USA) ELISA microplate reader اندازه‌گیری شد. این تست برای هر غلظت سه بار تکرار شـد. همچنـین جهـت تاییـد صحت سنجش MTT رنگ آمیزی با تریپان بلو انجام شد. به‌منظور تعیین درصـد سـلول‌هـای زنـده در هـر غلظـت عصاره، میانگین جذب‌های نوری سلول‌های تیمار شـده بـا غلظت مورد نظر از عصاره بر میـانگین جـذب‌هـای نـوری محلول معادل DMSO تقسیم و در نهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. غلظت موثر عصاره دارای سمیت سـلولی، با کمیتی به‌نام IC50 گزارش شد که نشان‌دهنده غلظتـی است که در آن نیمی از سلول‌ها زنده می‌باشند به‌منظـور محاسبه IC50 عصاره‌ها از نـرم‌افـزارPrism 5.0 اسـتفاده شد.

اندازه‌گیری بیان نسبی ODC1: بررسی کمی بیـان ژن ODC1 بـا اسـتفاده از تکنیـک Real-time PCR انجـام شد. بدین‌منظور ابتدا هر سه رده سلولی کشت داده شـد و در مرحله بعد غلظت‌های مختلف عصاره بـه آن‌هـا اضـافه شد و سلول‌ها به‌مدت ۴۸ سـاعت انکوبـه و سـپس جهـت استخراج RNA استفاده شدند. همه تیمارها در سه تکرار انجام شد.

جهت طراحی آغازگرهای ویژه ژن اورنیتین دکربوکسـیلاز (ODC1)از تـوالی مربـوط بـه mRNA ایـن ژن کـه در پایگـاه اطلاعـاتی NCBI بـا شـماره دسترسـی NM_002539.2 موجود است، اسـتفاده شـد. طراحـی آغازگر با در نظر گرفتن نکات استاندارد در طراحی آغازگر از جمله طول آغازگر، دمای اتصال، G+C% ، ایجاد دایمر، تولید لوپ یا حلقـه در درون هـر یـک از آغازگرهـا و ΔG مناسـب بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار Oligo (Naltional Biosciences Inc., Ver. 7.5) انجـام شـد. سـنتز آغازگرهای طراحی‌شده به‌واسطه شرکت ندای فـن راه در شانگهای چین انجام شد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های ODC1 و ACTB

نام آغازگر	توالی 5′ - 3′	طول نوکلئوتید	دمای ذوب (Tm)	GC%	طول قطعه تکثیر شده
ODC1-FW	GTGGGTGATTGGATGCTCTTTG	۲۲	۵۹/۸۳	۵۰	۱۰۸
ODC1-RV	ACCAGGCTAACTACTCGCTCAA	۲۲	۵۹/۰۳	۵۰	
ACT-FW	TCCATCATGAAGTGTGACGT	۲۰	۵۶/۸۷	۴۵	۱۵۴
ACT-RV	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	۲۲	۵۴/۳۲	۳۶/۳۶	

در این پژوهش Real-time PCR با استفاده از روش SYBR Green و با به‌کارگیری دستگاه ABL step-one(Applied Biosystems) انجام شد. cDNA ساخته‌شده از RNA استخراج شده از نمونه‌ها به‌عنوان الگو برای واکنش‌های qRT – PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن‌ها در نظر گرفته شد و ژن بتا اکتین هم به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. اجزای مختلف ۲۰ میکرو لیتر مخلوط واکنش qRT – PCR شامل ۱۰میکرولیتر SYBER Green PCR Master Mix(ABI) ، ۰/۴ میکرولیتر Forward primer، ۰/۴ میکرولیتر Reverse primer، ۶/۲ میکرولیتر H_2O و ۳ میکرولیتر cDNA است. شرایط چرخه دمایی و زمانی شامل، دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سپس برای ۴۰ چرخه، دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و نهایتا اتصال پرایمر و طویل شدن دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه بود. کنترل منفی برای هر پروسه نیز انجام شد. داده‌های حاصل از Real-time PCR با استفاده از روش ΔΔCt آنالیز گردید (با استفاده از ژن کنترل بتا اکتین).

آنالیز آماری

برای تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثرات سمیت سلولی از نرم‌افزار SAS استفاده شد. Ctهای مربوط به واکنش qRT – PCR از نرم‌افزار دستگاه Real-time PCRاستخراج و پس از محاسبه پارامترهای مربوطه آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزارExcel انجام شد.

نتایج

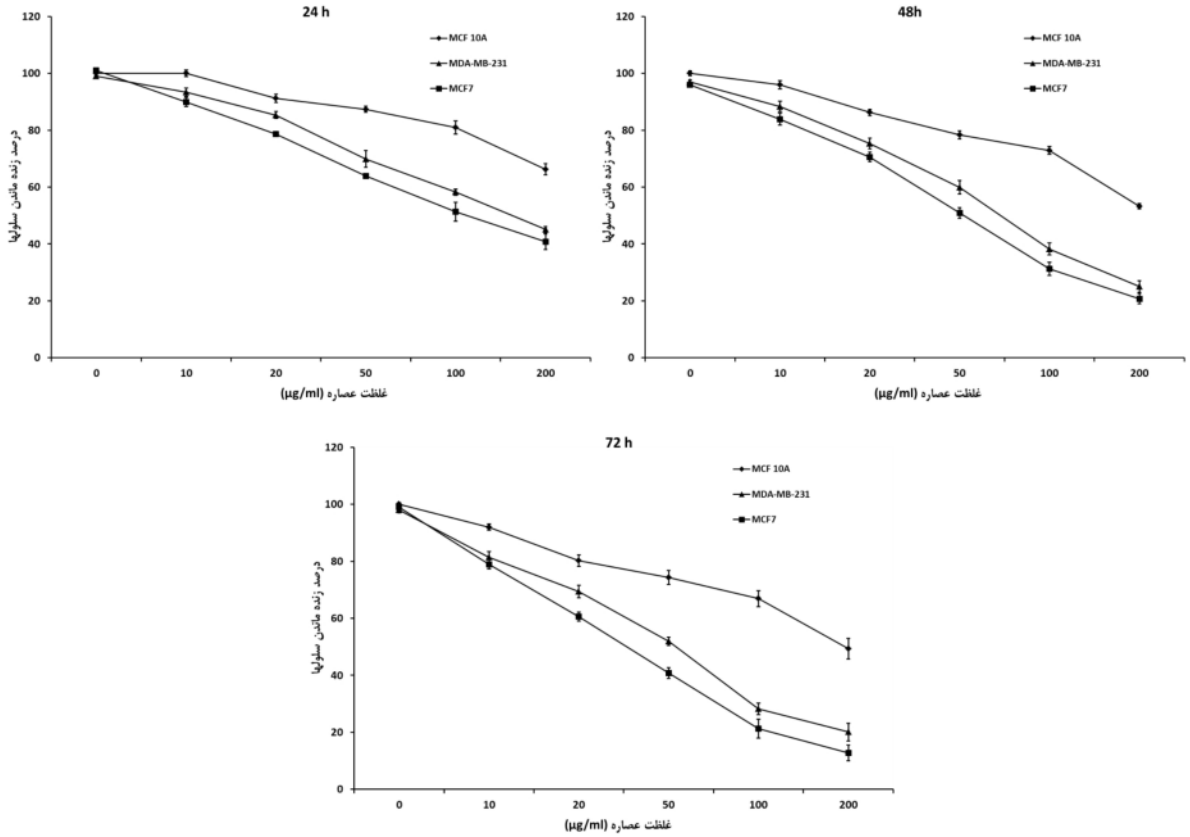
بررسی سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیرین‌بیان

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه شیرین‌بیان بر درصد زنده ماندن سلول‌ها نشان داد که با افزایش غلظت و زمان، تاثیر عصاره بر سلول‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر شده و افزایش قابل‌توجهی در مرگ و میر سلول‌ها دیده می‌شود. به‌طوری‌که از غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بعد اثرات سمیت سلولی عصاره محسوس‌تر است. با مقایسه اثرات عصاره این گیاه بر رده‌های سلولی مورد مطالعه مشخص شد که اثرات سمیت این عصاره بر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال به‌طور معنی‌داری بیشتر است، به‌گونه‌ای که به‌جز غلظت صفر عصاره در بقیه غلظت‌ها درصد زنده‌مانی سلول‌های نرمال (MCF-10A) از دو رده سرطانی (MCF-7, MBA-MD-231) به‌صورت معنی‌داری بیشتر است. همچنین در مقایسه بین دو رده سرطانی، رده MCF-7 تحت تأثیر بیشتری قرارگرفته است و درصد زنده‌مانی این رده سلولی به‌طور معنی‌داری کمتر از رده دیگر است (شکل ۱). عصاره این گیاه دارای اثر سمیت سلولی مؤثر بر سلول‌های سرطانی بوده و باعث کاهش

Archive of SID

www.SID.ir

بیش از ۵۰ درصد میزان بقای سلول‌ها (IC_{50}) مـی‌شـود که مقادیر آن در جدول ۲ آورده شده است.



شکل۱: منحنی تغییرات اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شیرین‌بیان بر درصد زنده‌مانی سه رده سلولی پستان. داده‌ها میانگین ۳ بار تکـرار درصـد زنـده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه انحراف معیار می باشد.

جدول۲: مقادیر IC_{50} (میکروگرم در میلی‌لیتر) برای رده‌های سلولی در زمان‌های متفاوت

رده سلولی	زمان		
	24 h	48 h	72 h
MCF-10A	>۳۰۰	۲۵۶/۶	۲۱۴/۱
MBA-MD-231	۱۵۰	۶۶/۹۹	۴۶/۷۲
MCF-7	۱۱۲/۱	۴۹/۳۸	۳۲/۳۵

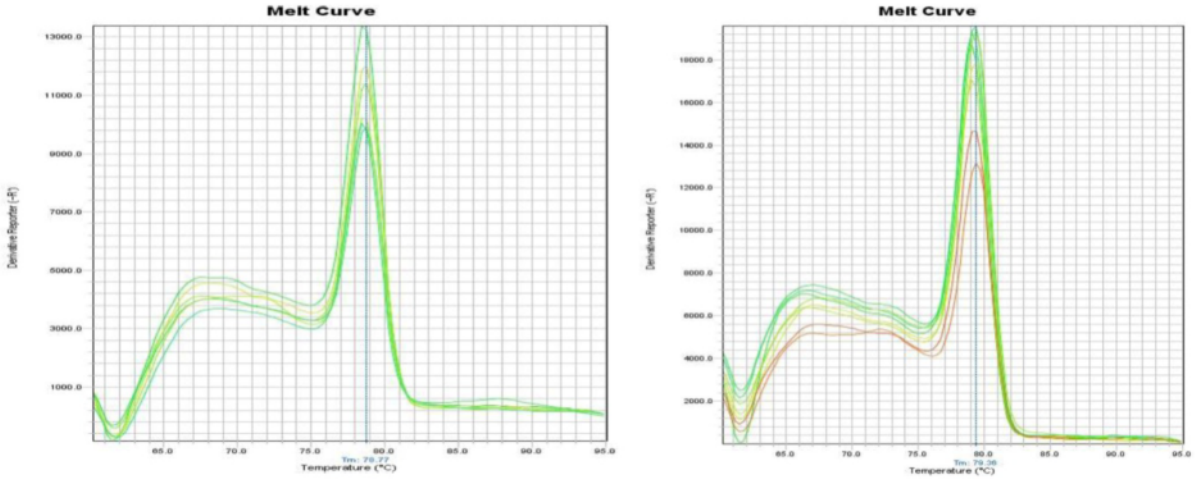
اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر میزان نسبی بیـان ژن ODC1

واکـنش qRT- PCR بـه‌روش Real – time SYBER Green PCR توســط دســتگاه ABI Step-One (Applied Biosystem) انجام شـد. در ایـن روش همـه داده های مربوط به ژن ODC1 بـا ژن ACTB بـه‌عنـوان کنترل داخلی نرمالایز شد و سپس میـزان تغییـرات بیـان ژن در غلظت‌های مختلف عصاره و رده‌های مختلف سلولی بررسی شد. نتایج این واکنش به‌صورت نمودارهای منحنی ذوب و تکثیـر ژن‌هـا کـه توسـط دسـتگاه ترسـیم شـد (شکل های۲ و۳). در نمودارهای منحنی ذوب وجـود یـک پیک و عدم حضور پیک های اضافی نشـان دهنـده تکثیـر اختصاصی قطعات مورد نظـر و رانـدمان مناسـب واکـنش PCR می‌باشد. نمودارهـای تکثیـر قطعـات نیـز حـاکی از

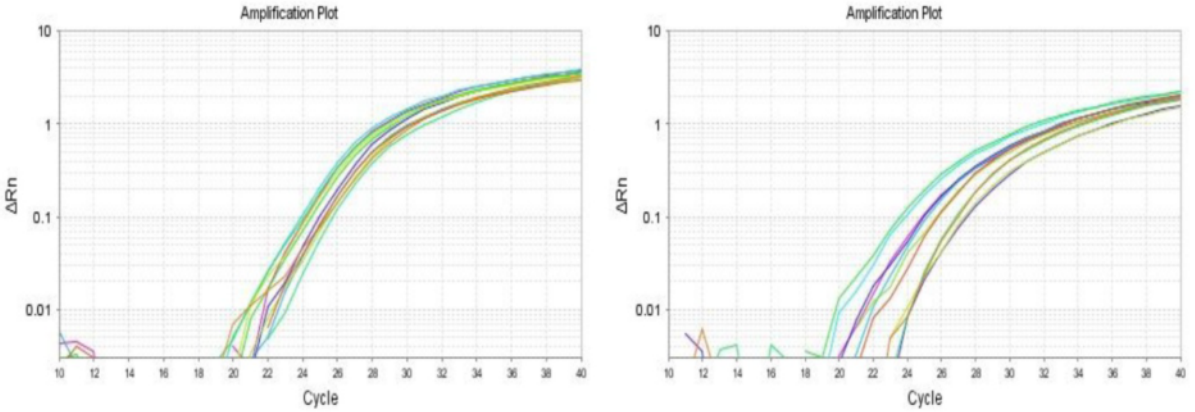
Archive

www.SID.ir

افـزایش مـوازی فلورسـانس تمـام نمونـه‌هـا طـی مرحلـه لگاریتمی رسیدن به ثبات نسبی تا چرخه ۴۰ است.



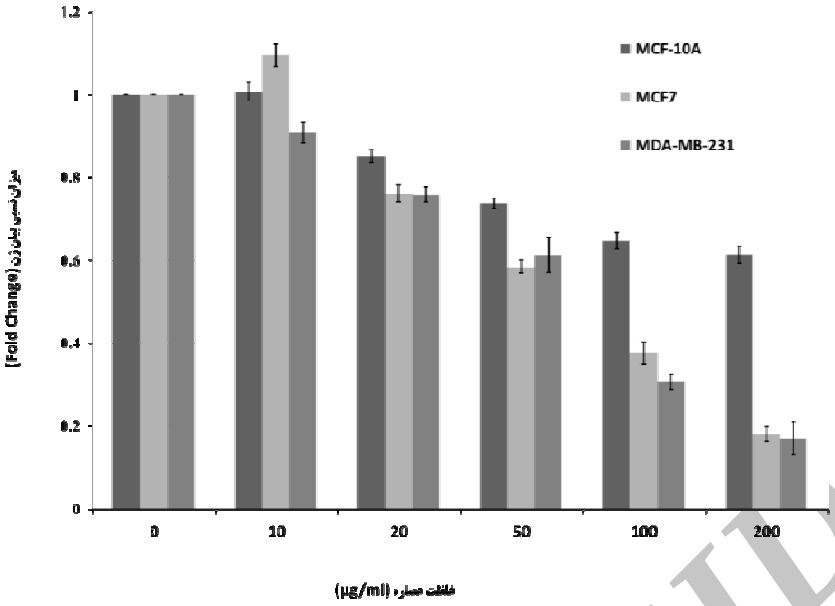
شکل ۲: منحنی ذوب محصولات Real-Time PCR برای ژن‌های ODC1 (سمت راست) و ACTB (سمت چپ). نقطه ذوب تمامی نمونه‌ها برای ژن‌هـای ACTB و ODC1 حدود ۷۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر است.



شکل ۳: منحنی فلورسانس نمونه‌های cDNA ژن‌های ، ODC1 (سمت راست) و ACTB (سمت چپ). از هر نمونه ۳ تکرار گذاشته شد تا میانگین نتیجـه آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. فلورسانس تمام نمونه‌ها به‌طور موازی طی مرحلـه لگـاریتمی افـزایش مـی‌یابـد و تـا چرخـه ۴۰ بـه ثبـات نسـبی می‌رسند.

مقایسه میـانگین تغییـرات بیـان ژن ODC1 در سـه رده سلولی تیمار شده بـا غلظـت‌هـای مختلـف عصـاره گیـاه شیرین‌بیان نشـانگر کـاهش بیـان ژن بـا افـزایش غلظـت عصاره‌ها نسبت به شاهد است. به‌طوری‌که در غلظـت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میزان نسبی بیـان ایـن ژن در سه رده نرمال، MDA-MB-231 و MCF-7 به‌ترتیب ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۳ برابـر کـاهش‌یافتـه اسـت. همچنـین در مقایسـه بیـان ایـن ژن در سـه رده سـلولی تحـت تـاثیر غلظت‌های مختلف می‌توان چنین اظهار داشت که در هـر غلظت عصاره کمترین بیان مربوط به رده سـلولی MDA-MB-231 اسـت، اگرچـه در غلظـت‌هـای ۲۰، ۵۰ و ۲۰۰ تفاوت معنی‌داری بـین ایـن رده و رده MCF-7 مشـاهده نمی‌شود (شکل ۴). بنابراین به‌طورکلی می‌توان گفت کـه بیان ژن ODC1 در رده MDA-MB-231 بیشتر تحـت تأثیر عصاره گیاه شیرین‌بیان قرارگرفته است.

www.SID.ir



شکل ۴: مقایسه تغییرات بیان ژن ODC1 در سه رده سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شیرین‌بیان. داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار در هر غلظت به‌همراه انحراف معیار می‌باشد.

بحث

گیاه شیرین‌بیان یک گیاه دارویی با ترکیبات شیمیایی و موثره مفید و متنوعی است و به‌همین دلیل در صنایع غذایی و دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. از این گیاه یک گلیکوزید تری ترپن بنام گلیسریزین به‌دست می‌آید که شیرین بوده و در بعضی کشورها مانند ژاپن جایگزین قند استفاده می‌شود (۱۱). اما گروه دیگری از ترکیبات که در ریشه این گیاه حضور دارند، ترکیبات فنلی -فلاونوئیدی هستند که مطالعات متعددی در زمینه خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانتی، سمیت سلولی و ضد سرطانی آن‌ها انجام‌شده است. به‌طور مثال در مطالعه Khazraei و همکاران (۱۴) نشان داده شده است که عصاره گیاه شیرین‌بیان بر رده‌های سلولی سرطان‌های معده‌ای روده‌ای تاثیر معنی‌داری داشته و از طریق القای آپوپتوزیس، موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی شده درحالی‌که بر سلول‌های نرمال هیچ‌گونه تاثیر معنی‌دار و منفی ندارد. همچنین در مطالعه Fu و همکاران (۱۰) فلاونوئید استروژنی Licochalcone استخراج شده از ریشه گیاه شیرین‌بیان فعالیت ضد توموری بر سلول‌های سرطانی پروستات (PC3) نشان داد.

نتایج این تحقیق مشخص کرد که این ترکیب فلاونوئیدی از طریق مهار سایکلین B1 و cdc2 سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M شده است. به‌علاوه در پژوهشی دیگر اثر فلاونوئید Glabridin بر سلول‌های رده-MDA MB-231و MCF-7 مطالعه شد و مشخص شد که تا غلظت ۱۰ میکرومولار این ترکیب رشد سلول‌های MCF-7 را تحریک کرده ولی بر روند رشد رده سلولی MDA-MB231 تأثیری نداشته است اما در غلظت‌های بالا رشد هر دو رده سلولی را مهار می‌کند (۱۵). همچنین عصاره اتانولی ریشه گیاه شیرین‌بیان در حضور ماده تتراکلرو دنیترودیوکسین (TCDD) که تحریک‌کننده رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 است، سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت 200 میکروگرم در میلی‌لیتر شد و مشخص شد که عمل کاهش رشد از طریق متوقف کردن چرخه سلولی در مرحله G2/M رخ می‌دهد (۱۶). نتایج ما در این مطالعه مشخص کرد که عصاره گیاه شیرین‌بیان بر رده‌های سلولی موردمطالعه دارای اثر سمیت سلولی به‌روش وابسته به دوز و زمان است. به‌طوری‌که باگذشت زمان IC_{50} عصاره شیرین‌بیان در هر سه رده سلولی کاهش نشان داد (جدول ۱). البته باید

Archive of SID

www.SID.ir

خاطر نشان کرد که رده سلولی نرمال (MCF-10A) کمترین تاثیرپذیری را از عصاره گیاهی داشته است و می‌توان گفت که عصاره‌ها دارای سمیت انتخابی بر سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 بوده و در نتیجه خاصیت ضد سرطانی دارند. بر اساس نتایج، سمیت سلولی عصاره گیاه شیرین‌بیان بر رده سلولی با گیرنده استروژن (استروژن مثبت) MCF-7 بیشتر از رده سلولی MDA-MB-231 (استروژن منفی) است که این موضوع می‌تواند به دلیل فقدان محرک استروژن در عصاره آبی این گیاه باشد.

اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) از آنزیم‌های مهم در سنتز پلی‌آمین‌ها است و تجمع پلی‌آمین‌ها در انواع متعددی از سلول‌های سرطانی دیده‌شده است (۳). در نتیجه میزان فعالیت آنزیم ODC می‌تواند به‌عنوان شاخص زیستی در تخمین رشد و پیشرفت تومور در نظر گرفته شود. لذا کاهش میزان بیان ژن ODC1 و یا مهار فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز راه‌کاری مناسب برای جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی است (۹, ۱۷). در دهه اخیر استفاده از ترکیبات با منشا گیاهی یا عصاره‌های گیاهی در تحقیقات ضد سرطان و به‌ویژه در راستای کاهش پلی آمین‌ها و اورنیتین دکربوکسیلاز رو به فزونی گذاشته است که می‌توان به تیمار خوراکی موش‌های مبتلا به سرطان پوست با ماده گلیسریزین استخراج شده از ریشه گیاه شیرین‌بیان اشاره کرد که سبب کاهش رشد تومورها و همچنین باعث کاهش فعالیت آنزیم ODC در تومورها شد (۱۸). همچنین در پژوهشی دیگر میزان mRNA ژن ODC1 در بافت‌های سرطانی و غیر سرطانی ریه انسان مقایسه شد و مشخص شد میزان mRNA این ژن در بافت‌های سرطانی به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از بافت‌های غیر سرطانی است (۱۹). در مطالعه Wang و همکاران (۲۰) مشخص شد که هیدروکسی دی بنزوئیل متان و دی بنزوئیل متان از فلاونوئیدهای ریشه گیاه شیرین‌بیان اثر ضد سرطانی بر سلول‌های سرطانی پوست دارند. این ترکیبات از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تخریب غشای داخلی میتوکندری سبب القای آپوپتوزیس می‌شوند. همین‌طور با فعال‌سازی آنزیم‌هایی مانند کوئینون اکسیدو ردوکتاز سبب تخریب پروتئین ODC می‌شوند.

نتایج این تحقیق حاکی از کاهش معنی‌دار بیان ژن ODC1 در دو رده سلولی سرطانی تحت تیمار عصاره پس از ۴۸ ساعت بود. در خصوص مکانیسم کاهش بیان این ژن توسط عصاره گیاه شیرین‌بیان اطلاعی در دست نیست اما به‌دلیل وجود عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتری این ژن، تنظیم در سطح رونویسی از طریق این عناصر می‌تواند یکی از عوامل باشد. مهار بیان ژن ODC1 و متعاقبا کاهش میزان آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز منجر به پایین آمدن سطح پلی‌آمین‌ها در سلول‌های سرطانی می‌شود. کمبود پلی‌آمین‌ها به‌عنوان جاروب کننده رادیکال‌های آزاد سبب تجمع این رادیکال‌ها و وقوع آپوپتوزیس می‌شود. در مقایسه بین دو رده سرطانی میزان کاهش بیان ژن ODC1 در رده MDA-MB-231 نسبت به رده MCF7 به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشتر بود در حالی که سمیت عصاره در رده MCF7 بیشتر بود. پاسخ متفاوت این دو رده سلولی، می‌تواند به تفاوت‌های ژنتیکی این دو رده مربوط باشد به‌طوری‌که رده MCF7 واجد گیرنده استروژن و پروژسترون و فاقد گیرنده HER2 است (ER+/PR+/HER2−). در حالی‌که رده MDA-MB-231 فاقد هر سه گیرنده استروژن، پروژسترون و HER2 است (۲۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بیانگر سمیت انتخابی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان بر سلولهای سرطانی رده MCF7 است. در رابطه با مکانیسم احتمالی اثر این عصاره گیاهی، اگرچه در مطالعات مختلف دلایل زیادی همچون مهار چرخه سلولی، وقوع آپوپتوزیس برای توجیه اثر سمیت سلولی عصاره‌های گیاهی ذکر شده است اما با توجه به نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیق حاضر می‌توان احتمال داد که عصاره گیاه شیرین‌بیان با کاهش بیان ژن ODC1 که نقش اساسی در شکل‌گیری سرطان و تداوم آن دارد، سبب سمیت سلولی می‌شود.

تشکر و قدردانی

کلیه اعتبار مالی پژوهش حاضرتوسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور تامین شده است، که به این وسیله تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1.Siegel RL, Miller KD , Jemal A. Cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2016; 66(1): 7-30.

2.Parsa N. Molecular and Cellular Basis of Human Cancer. Journal of Cell & Tissue. 2012; 2(4): 365-376.

3.Deng W, Jiang X, Mei Y, Sun J, et al. Role of ornithine decarboxylase in breast cancer. Acta biochimica et biophysica Sinica. 2008; 40(3): 235-43.

4.Arisan ED, Akkoc Y, Akyuz KG, Kerman EM, et al. Polyamines modulate the roscovitine-induced cell death switch decision autophagy vs. apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. Molecular medicine reports. 2015; 11(6): 4532-40.

5.Brown I, Halliday S, Greig H, Heys SD, et al. Genetic polymorphism in ornithine decarboxylase and risk of breast cancer. Familial cancer. 2009; 8(4): 307-11.

6.Love, RR, Astrow, SH, Cheeks, AM , Havighurst, TC. Ornithine decarboxylase (ODC) as a prognostic factor in operable breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2003; 79(3): 329-334.

7.Zhu Q, Jin L, Casero RA, Davidson NE, et al. Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor alpha expression and growth in human breast cancer cells. Breast cancer research and treatment. 2012; 136(1): 57-66.

8.Thomas TJ, Thomas T, John S, Hsu HC, et al. Tamoxifen metabolite endoxifen interferes with the polyamine pathway in breast cancer. Amino acids. 2016; 48(10): 2293-302.

9.Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M , Khafi A. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by *Nepeta binaloudensis*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2017; 27(1): 84-90.

10.Fu Y, Chen J, Li YJ, Zheng YF, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. Food chemistry. 2013; 141(2): 1063-1071.

11.Wang L, Yang R, Yuan B, Liu Y, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. Acta pharmaceutica Sinica. B. 2015; 5(4): 310-5.

12.Yang R, Wang LQ, Yuan BC , Liu, Y. The Pharmacological Activities of Licorice. Planta medica. 2015; 81(18): 1654-69.

13.Kao TC, Wu CH , Yen GC. Bioactivity and potential health benefits of licorice. Journal of agricultural and food chemistry. 2014; 62(3): 542-53.

14.Khazraei-Moradian S, Ganjalikhani-Hakemi M, Andalib A, Yazdani R, et al. The Effect of Licorice Protein Fractions on Proliferation and Apoptosis of Gastrointestinal Cancer Cell Lines. Nutrition and Cancer. 2017; 69(2): 330-339.

15.Hsu YL, Wu LY, Hou MF, Tsai EM, et al. Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by inhibiting focal adhesion kinase/Rho signaling pathway. Molecular nutrition & food research. 2011; 55(2): 318-327.

16.Chu XT, de la Cruz J, Hwang SG , Hong H. Tumorigenic effects of endocrine-disrupting chemicals are alleviated by licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root extract through suppression of AhR expression in mammalian cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(12): 4809-4813.

17.Smirnova OA, Isaguliants MG, Hyvonen MT, Keinanen TA, et al. Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine

Archive of SID

www.SID.ir

decarboxylase and spermidine/spermine-N 1-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells. Biochimie. 2012; 94(9): 1876-1883.

18.Rahman S , Sultana S. Glycyrrhizin exhibits potential chemopreventive activity on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in Swiss albino mice. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 2007; 22(3): 363-9.

19.Grimminger PP, Schneider PM, Metzger R, Vallböhmer D, et al. Ornithine decarboxylase mRNA expression in curatively resected non–small-cell lung cancer. Clinical lung cancer. 2010; 11(2): 114-119.

20.Wang MF, Liao YF, Hung YC, Lin CL, et al. Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Experimental & molecular medicine. 2011; 43(4): 189-196.

21.Srisawat T, Sukpondma Y, Graidist P, Chimplee S, et al. The dose dependent in vitro responses of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines to extracts of Vatica diospyroides Symington type SS fruit include effects on mode of cell death. Pharmacogn. Mag. 2015;11(Suppl 1), S148.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2017; 8(1)

Original Article

Effect of *Glycyrriza glabra* L. extract on ODC1 gene expression and cell proliferation in human breast cancer cell lines

Safipour Afshar A. Ph.D.*, Saeid Nematpour F. Ph.D., Lakzian M. M.Sc.

- Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

* Email corresponding author: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

Received: 23 Apr. 2017 Accepted: 23 Jul. 2017

Abstract

Aim: Product of ODC1 gene is key enzyme in polyamines synthesis that in diverse cancers their content increases. In the present study the effects of root extract of licorice on the ODC1gene expression and cell viability of two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and non-cancer cell line (MCF-10A) were evaluated.

Material and Methods: The cell lines were subjected to increasing doses of the extract ranging from 0-200 µg⁄ml. Cytotoxic effect was assessed using the MTT assay. Expression of ornithine decarboxylase 1 gene was analyzed by Real Time PCR.

Results: In cancerous cell lines mortality increases significantly by a concentration-dependent manner. Moreover, a marked decrease observed in the expression of ODC1 gene in cancer cell lines. In comparison of two cancer cell lines, MDA-MB-231cell line more affected by licorice root extract.

Conclusion: The result of our study highlights the potential influences of *Glycyrrhiza glabra* extract on ODC1 gene expression in breast cancer cells and its relation to inhibition of cancer cell growth.

Keywords: ODC1, Anticancer, licorice, cytotoxic.

Archive of SID

www.SID.ir