

بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره ریشه شیرین بیان بر رده سلولی 4T1 استخراج شده از بافت سرطانی پستان موش سوری BALB/c

احمد همتا^۱، سیدمحمدعلی شریعت زاده^۲، ملک سلیمانی مهرنجانی^۳، حسن فلاح حسینی^۴، فهیمه حسین آبادی^{۵*}

- ۱- استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۲- استاد، دکترای بافت و جنین، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۳- دانشیار، دکترای بافت و جنین، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۴- استادیار، دکترای داروشناسی، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
 - ۵- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری گرایش سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اراک، اراک، ایران
- *آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
 صندوق پستی: ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶، تلفن: ۴۱۷۳۴۰۱ (۰۸۶۱)، نمابر: ۴۱۷۳۴۰۹ (۰۸۶۱)
 پست الکترونیک: fahimehhosseinabadi@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۷

چکیده

مقدمه: گیاه دارویی شیرین بیان به طور وسیعی در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. تحقیقات جدید نشان داده است که اثرات درمانی ریشه شیرین بیان توسط ماده مؤثره آن به نام گلیسیریزیک اسید با خواص آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌شود و این اثر احتمالاً روی سلول‌های سرطانی می‌تواند اثرات سایتوتوکسیک داشته باشد.

هدف: در این پژوهش اثر سایتوتوکسیک عصاره ریشه شیرین بیان روی سلول‌های سرطانی پستان موش سوری BALB/c بررسی شد.

روش بررسی: رده سلولی 4T1 در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد. غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان (۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تاکسول (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ نانومولار) و همچنین ترکیب عصاره با تاکسول، به مدت ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های سرطانی اثر داده شد. در ادامه توانایی حیات سلول‌ها با استفاده از روش MTT و تریان‌بلو و مورفولوژی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیداید بررسی شد.

نتایج: عصاره ریشه شیرین بیان و داروی تاکسول به طور مشابه بر روی سلول‌های سرطانی دارای اثرات سایتوتوکسیک قابل توجهی بودند. همچنین ترکیب عصاره با تاکسول، سبب افزایش اثر سایتوتوکسیک تاکسول شد. بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها نشان داد که در سلول‌های تیمار شده توسط تاکسول و عصاره تغییراتی همانند فروپاشی، متراکم شدن و تغییر شکل هسته ایجاد شده است.

نتیجه‌گیری: سمیت عصاره ریشه شیرین بیان منجر به ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های رده 4T1 شد و کاهش قدرت زیستی سلول‌ها وابسته به دوز و زمان بود.

کل واژگان: رده سلولی 4T1، سایتوتوکسیک، شیرین بیان



مقدمه

دادند که میزان این ماده در ریشه‌ها در حدود ۱/۷۷ درصد بود و در بخش‌های سبز گیاه گلیسیریزینی وجود نداشت [۹، ۱۲]. این ترکیب به عنوان مخلوطی از نمک‌های پتاسیم - منیزیم - کلسیم گلیسیریزیک اسید است [۱۴، ۱۳].

لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیسیته عصاره گیاه شیرین‌بیان بر توانایی حیات و مورفولوژی سلول‌های سرطان پستان (رده سلولی 4T1) و میزان اثربخشی آن در مقایسه با داروی رایج تاکسول و همچنین پاسخ به این پرسش که آیا استفاده همزمان این عصاره با داروی تاکسول تأثیری بر میزان سایتوتوکسیسیته این دارو دارد یا خیر، طراحی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا رده سلولی 4T1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سپس سلول‌ها دفریز شده و بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در انکوباتور CO2 دار کشت داده شدند.

تهیه عصاره گیاهی

گیاه شیرین‌بیان در خردادماه از منطقه تفت در استان یزد جمع‌آوری و بعد از شست و شوی در سایه و دمای اتاق خشک شد. یک نمونه گیاه توسط دکتر حسن نظریان شناسایی و در هرباریوم مرکز آموزش عالی کشاورزی امام خمینی کرج، نگهداری و کد 358IHEC به این گیاه تعلق گرفت. ریشه‌های خشک شده را آسیاب نموده، به روش پرکولاسیون با حلال متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری انجام شد. پودر به دست آمده از ریشه شیرین‌بیان ۳۵۰ گرم بود و در انتها ۴۸ گرم عصاره شیرین‌بیان به دست آمد. بعد از عصاره‌گیری حلال به وسیله روتاری تبخیر شد [۱۵]. عصاره‌های خشک تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. عصاره در دی متیل سولفوکساید حل شد و غلظت‌های مورد نیاز، در محیط کشت آماده شد (غلظت نهایی دی متیل سولفوکساید در محیط کشت از ۰/۱ درصد تجاوز نکرد، که تأثیری بر عملکرد سلول‌ها

سرطان پستان تومور بدخیمی است که از سلول‌های پستان منشا می‌گیرد [۱]. این بیماری بیشتر در زنان دیده می‌شود و بروز آن در مردان بسیار نادر است [۲]. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان زنان و دومین دلیل مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه می‌باشد. این سرطان ۳۲ درصد کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد و احتمال ابتلای یک خانم در طی ۹۰ سال زندگی ۱ به ۸ می‌باشد [۳].

تاکسول یک آلکالوئید دی‌ترپنوئید با منشا گیاهی است. تاکسول یک ماده مهم مورد استفاده در درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها (از جمله سرطان تخمدان، پستان، شش، کارسینومای سر و گردن) می‌باشد [۴، ۵].

محققان تاکنون بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را گزارش کرده‌اند که از زمان‌های بسیار دور در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۶]. داروهای گیاهی به علت عدم وجود عوارض جانبی، اهمیت بیشتری در پیشگیری انواع سرطان دارند. دانشمندان در حال بررسی منابع مختلف دارویی با درمان مؤثر و بدون عوارض جانبی می‌باشند [۷، ۸].

گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* از گیاهان بومی ایران می‌باشد و ریشه آن حاوی ترکیبات مهمی چون گلیسیریزین، فلاونوئید (ایزولیکوئیرتین و لیکوئیرتین)، ایزوفلاونوئید، کومارین و فیتواستروژن می‌باشد. ایزوفلاون‌های موجود در این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند. ارزش درمانی این گیاه در موارد: ضد سرفه، ضد دیابت، ضد میکروب و ویروس ثابت شده است. تحقیقات اخیر بر روی فعالیت عصاره و ترکیبات ریشه شیرین‌بیان، از لحاظ فعالیت ضد تکثیری، فوکوس شده است [۹، ۱۰، ۱۱].

مهم‌ترین ماده فعال ریشه شیرین‌بیان، گلیکوزید تری‌ترین (ساپونین) به نام گلیسیریزین (C₄₂H₂₂O₁₆) با وزن مولکولی ۸۲۲/۹ گرم می‌باشد. این ماده ۵۰ بار از شکر شیرین‌تر است و محدوده وسیعی از خواص فارماکولوژیکی را نشان می‌دهد. گلیسیریزین بیش از ۲۴ درصد از وزن خشک ریشه‌ها را تشکیل می‌دهد. فوگرسبرگر و فرانز در سال ۱۹۸۴، با شناسایی و تعیین میزان گلیسیریزین در اندام‌های مختلف گونه *G. glabra* نشان



با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول‌ها در هر غلظت محاسبه شد [۱۷].

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} = \text{توانایی زیستی سلول ها}$$

۲. روش متیل تiazول تترازولیوم (MTT): روشی برای تعیین سلول‌های زنده در بسیاری از نمونه‌های بیولوژیک می‌باشد. در این روش، MTT یا دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم که ماده‌ای زرد رنگ است به نمونه‌ها افزوده می‌شود، تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز شکسته شده و فورمازون نامحلول ایجاد می‌کند، میزان فورمازون به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری می‌شود [۱۷]. در اجرای این روش، به ترتیب زیر عمل شده است: سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۹۶ خانه به منظور چسبیدن به کف پلیت کشت داده شدند، سپس با غلظت‌های مذکور از عصاره ریشه شیرین‌بیان تیمار و پس از زمان‌های ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت، محیط هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین شد و به هر یک از چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر محلول متیل تiazول تترازولیوم (Sigma، آلمان) اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس بلورهای فورمازون حاصل در دی متیل سولفوکساید حل و جذب آن توسط دستگاه ELISA-reader در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. این تست برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر، در مورد هر غلظت محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} = \text{توانایی زیستی سلول ها}$$

تمامی مراحل فوق برای تاکسول (Stragen pharma سوئیس) با غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ نانومول بر لیتر تکرار و نتایج ثبت شد. به منظور بررسی اثر کاهنده و یا افزایش عصاره بر سایتوتوکسیسیته القا شده توسط تاکسول، تاکسول به همراه عصاره به صورت همزمان و با دوزهای متناظر (دوزهای ۱/۲۵ + ۵۰، ۲/۵ + ۱۰۰، ۵ + ۲۰۰، ۱۰ + ۴۰۰

نداشته باشد)، سپس با گذراندن آن از فیلتر با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل و تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شد.

اندازه‌گیری میزان گلیسیریزیک اسید موجود در عصاره ریشه شیرین‌بیان

ابتدا برای اندازه‌گیری، محلول‌های استاندارد از نمک آمونیوم گلیسیریزیک اسید (Glycyrrhizic acid ammonium salt) در پنج غلظت متفاوت (۶/۲۵ الی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در آب دیونیزه ساخته شد. سپس مقدار جذب محلول‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۵۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. بدین صورت نمودار استاندارد حاصل شد. در ادامه غلظت‌هایی برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره ساخته شد و جذب محلول‌های ساخته شده در طول موج ذکر شده اندازه گرفته شد. سپس غلظت مجهول با توجه به منحنی استاندارد محاسبه شد [۱۶].

801.13 ± 4.91 mg Glycyrrhizic acid/g extract

سنجش توانایی حیات سلولی

سلول‌های 4T1 پس از ۲۴ ساعت کشت در پلیت ۱۲ خانه، در معرض تیمار با دوزهای مختلف عصاره ریشه شیرین‌بیان (۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مدت زمان ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت قرار گرفتند. برای سنجش توانایی حیات سلول‌های تیمار شده با عصاره ریشه شیرین‌بیان از دو روش تریپان‌بلو و متیل تiazول تترازولیوم (Methyl Thiazol Tetra Zolium- MTT) استفاده شد.

۱. روش تریپان‌بلو: ابتدا سلول‌های کشت داده شده، با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی‌لیتر رسید و سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان‌بلو (Sigma، آلمان) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول‌های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و به صورت درصد بیان شد. در این روش، سلول‌های مرده به علت نفوذپذیری به تریپان‌بلو، به رنگ آبی دیده شد. این تست برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد. سپس



مختلف نشان داد که روند کاهش درصد توان زیستی سلول‌ها با افزایش غلظت و با گذشت زمان همراه است (جدول شماره‌های ۱، ۲). البته همان‌طور که گفته شد این مسأله در مورد عصاره به طور کامل صدق نمی‌کرد زیرا دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه کنترل سبب تحریک رشد سلول‌ها شدند.

آنالیز واریانس دو طرفه داده‌های به دست آمده از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو نشان داد که دوز مصرفی و زمان تیمار (با عصاره شیرین‌بیان و تاکسول) دارای اثر متقابل بر توان زیستی سلول‌های سرطانی می‌باشد، که باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) توانایی حیات سلول‌های سرطانی می‌شود (جدول شماره‌های ۱، ۲).

علاوه بر این آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از روش متیل تیازول تترازولوم نشان داد که کاهش توانایی حیات سلول‌های سرطانی وابسته به دوز و زمان تیمار بوده و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو را تأیید کرد (جدول شماره‌های ۳، ۴).

استفاده هم‌زمان تاکسول و عصاره متانولی ریشه شیرین‌بیان (به جز دو غلظت ترکیبی اول و دوم) موجب افزایش اثر سایتوتوکسیک تاکسول بر سلول‌های سرطانی شده و میانگین درصد حیات این سلول‌ها را نسبت به زمانی که تحت تیمار با تاکسول (به تنهایی) قرار داشتند در سطح معناداری ($p < 0.001$) کاهش داده است (نمودار شماره‌های ۱، ۲ و ۳).

تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با دوز ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و ۲۰ نانومول بر لیتر تاکسول در مدت زمان ۴۸ ساعت با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست شامل متراکم شدن، فروپاشی و تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل بود. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هم‌زمان هوخست و پروپیدیوم آیوداید نشان داد که در مقابل سلول‌های زنده با هسته‌های آبی رنگ، هسته سلول‌های مرده قرمز رنگ شده‌اند. رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید افزایش تخریب غشاء و مرگ سلول‌ها در مقایسه با کنترل را نشان داد (شکل شماره ۱).

و ۲۰ + ۸۰۰) روی سلول‌ها اثر داده شده و توانایی زیستی سلول‌ها به دو روش جذب تریپان‌بلو و رنگ‌سنجی MTT - چنانچه پیش‌تر توضیح داده شد - محاسبه شد. با توجه به نتایج آماری آزمون‌های تریپان‌بلو و متیل تیازول تترازولوم، دوز ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره و ۲۰ نانومول بر لیتر برای تاکسول و مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت برای بررسی تغییرات مورفولوژیک انتخاب شد. رنگ‌آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته، پروپیدیوم آیوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده، توسط میکروسکوپ فلورسنت انجام شد.

آنالیز آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS برای مقایسه تفاوت میانگین قابلیت حیات سلول‌ها در دوزها و زمان‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (One - Way ANOVA) و برای تعیین اثر متقابل دوز و زمان تیمار بر قابلیت حیات سلول‌ها از روش آنالیز واریانس دوطرفه (Two Way) استفاده شد. جهت مقایسه گروه تیمار ترکیبی عصاره شیرین‌بیان و تاکسول نسبت به تاکسول به تنهایی از روش t-test استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تأثیر عصاره ریشه شیرین‌بیان بر توان زیستی سلول‌ها حاکی از آن بود که دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه کنترل سبب تحریک رشد سلول‌ها شدند. به طور کلی زمانی که غلظت‌های پایین عصاره به سلول‌ها اضافه شد، کاهش معنی‌داری در توان زیستی سلول‌ها مشاهده نشد. با این حال یک رابطه معکوس بین توان زیستی سلول‌ها و غلظت‌های بالای عصاره بخصوص پس از زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار مشاهده شد (جدول شماره ۱). به طور کلی مقایسه داده‌ها در روش آنالیز واریانس یک طرفه در دوزهای مورد استفاده برای عصاره و تاکسول برای زمان‌های



جدول شماره ۱- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف عصاره متانولی ریشه شیرین بیان در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش تریپان بلو و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح معنی‌دار $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. (One Way ANOVA and Two Way, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز ($\mu\text{g/ml}$)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0/001	$85/00^a \pm 2/00$	$87/00^{ab} \pm 3/00$	$90/33^{ab} \pm 1/25$	۰
	$88/22^a \pm 3/02$	$92/10^a \pm 2/00$	$98/01^a \pm 1/00$	۵۰
	$84/15^a \pm 3/99$	$88/44^{ab} \pm 4/07$	$94/00^{ab} \pm 2/00$	۱۰۰
	$78/01^{ab} \pm 4/00$	$80/23^b \pm 3/02$	$88/84^{bc} \pm 3/45$	۲۰۰
	$68/26^b \pm 5/02$	$70/00^c \pm 4/00$	$80/26^{cd} \pm 5/02$	۴۰۰
	$37/64^c \pm 8/07$	$58/62^d \pm 5/10$	$73/05^d \pm 4/00$	۸۰۰
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a, b, c, d همگی در یک ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ab, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف a یا b دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. bc این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا c دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. cd, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف c یا d دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش تریپان بلو و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح معنی‌دار $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. (One Way ANOVA and Two Way, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز ($\mu\text{g/ml}$)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0/001	$88/23^a \pm 3/00$	$92/09^a \pm 1/54$	$98/23^a \pm 1/64$	۰
	$84/72^a \pm 6/57$	$89/82^a \pm 4/25$	$96/51^a \pm 2/35$	۱/۲۵
	$81/17^{ab} \pm 4/03$	$87/43^a \pm 3/75$	$93/02^a \pm 4/81$	۲/۵
	$72/77^{bc} \pm 3/40$	$83/50^a \pm 5/01$	$89/35^a \pm 3/50$	۵
	$65/04^c \pm 2/00$	$72/19^b \pm 1/09$	$76/16^b \pm 6/00$	۱۰
	$40/64^d \pm 2/89$	$60/33^c \pm 6/13$	$69/40^b \pm 3/00$	۲۰
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a, b, c, d همگی در یک ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ab, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف a یا b دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. bc, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا c دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند.



جدول شماره ۳- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف عصاره متانولی ریشه شیرین بیان در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش MTT و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. (One Way ANOVA and Two Way, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز ($\mu\text{g/ml}$)
	۷۲	۴۸	۲۴	
	$100/00^a \pm 0/00$	$100/00^a \pm 0/00$	$100/00^a \pm 0/00$	۰
	$106/21^a \pm 3/90$	$110/81^b \pm 5/17$	$125/64^b \pm 2/59$	۵۰
	$100/20^a \pm 4/88$	$106/13^{ab} \pm 2/35$	$120/66^b \pm 5/41$	۱۰۰
0/001	$77/02^b \pm 1/65$	$85/34^c \pm 2/36$	$92/16^a \pm 5/93$	۲۰۰
	$64/03^c \pm 3/29$	$78/00^c \pm 2/57$	$89/51^a \pm 6/35$	۴۰۰
	$41/90^d \pm 3/37$	$50/19^d \pm 4/40$	$75/02^c \pm 5/92$	۸۰۰
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.

در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a, b, c و d همگی در یک ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ab این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف a یا b دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند.

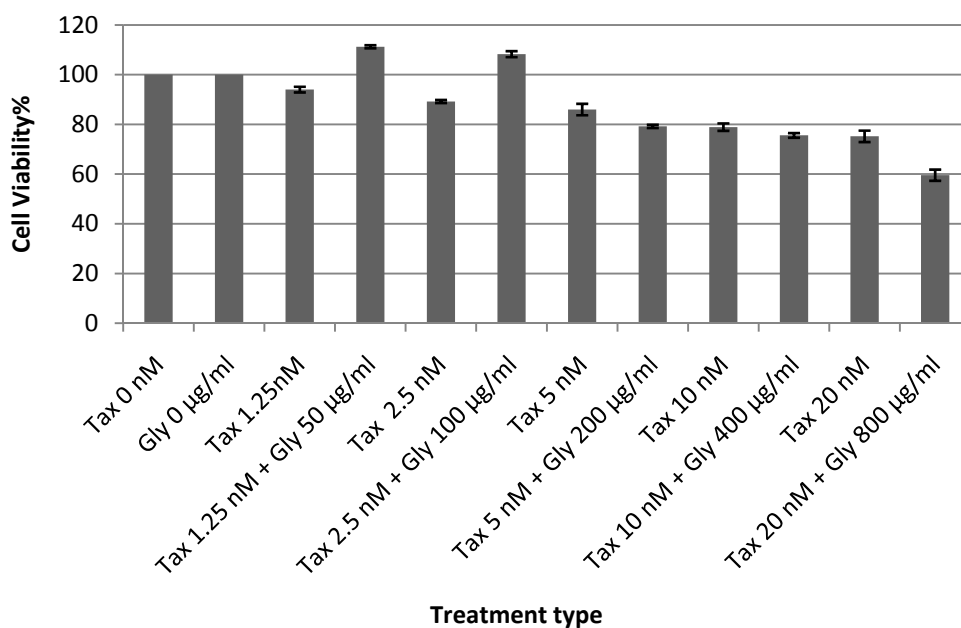
جدول شماره ۴- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش MTT و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. (One Way ANOVA and Two Way, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز ($\mu\text{g/ml}$)
	۷۲	۴۸	۲۴	
	$100/00^a \pm 0/00$	$100/00^a \pm 0/00$	$100^a \pm 0/00$	۰
	$81/23^b \pm 2/03$	$88/19^b \pm 1/75$	$94/01^{ab} \pm 2/00$	۱/۲۵
	$78/87^{bc} \pm 2/58$	$85/20^{bc} \pm 2/87$	$89/23^{bc} \pm 1/07$	۲/۵
0/001	$72/31^c \pm 1/59$	$78/72^c \pm 2/52$	$86/01^{cd} \pm 4/00$	۵
	$60/31^d \pm 3/48$	$70/09^d \pm 5/00$	$78/91^{de} \pm 2/60$	۱۰
	$49/28^e \pm 4/52$	$61/22^e \pm 1/07$	$75/21^e \pm 4/01$	۲۰
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

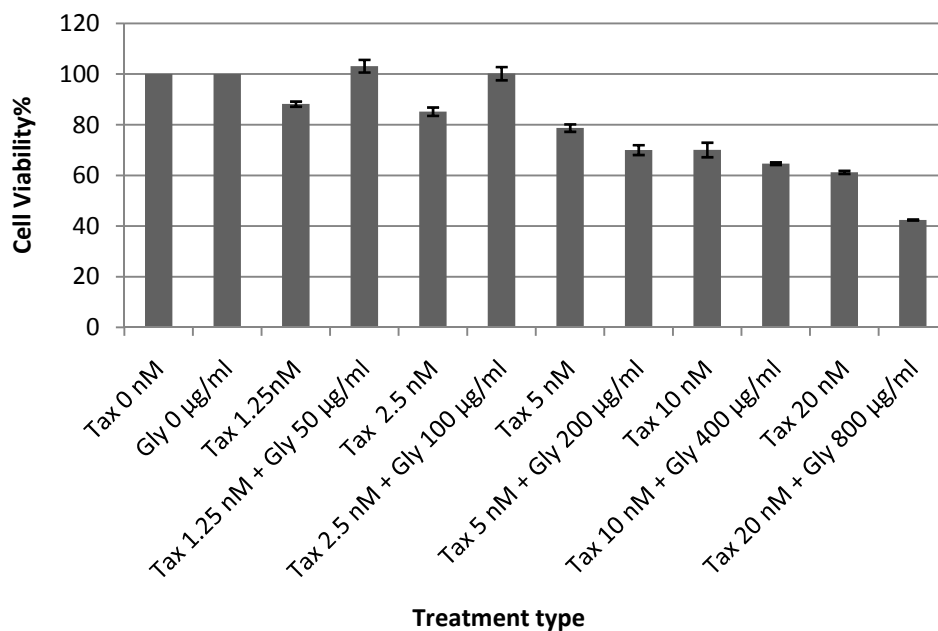
* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.

a, b, c, d و e همگی در یک ستون یا یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ab این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف a یا b دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. bc این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا c دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. cd این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف c یا d دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند. de این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف d یا e دارند با سایر داده‌ها از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار هستند.



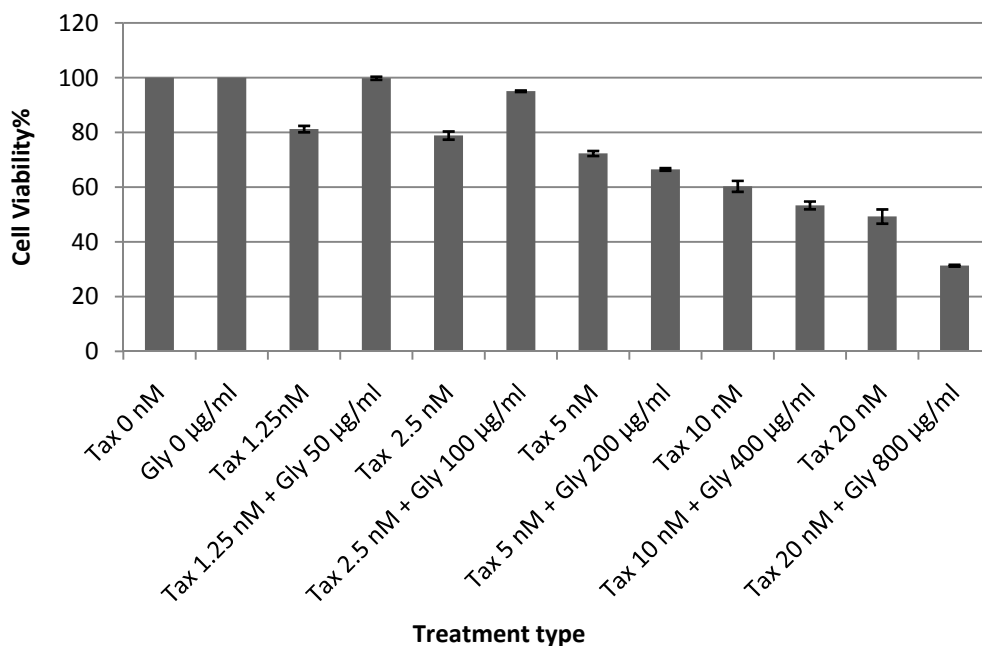


نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین درصد حیات سلول‌های سرطانی تحت تأثیر تاکسول به تنهایی و در ترکیب با عصاره متانولی ریشه شیرین بیان (رنگ‌سنجی MTT) پس از ۲۴ ساعت تیمار (t-test, $p < 0.05$; Error bars: Std. Error)

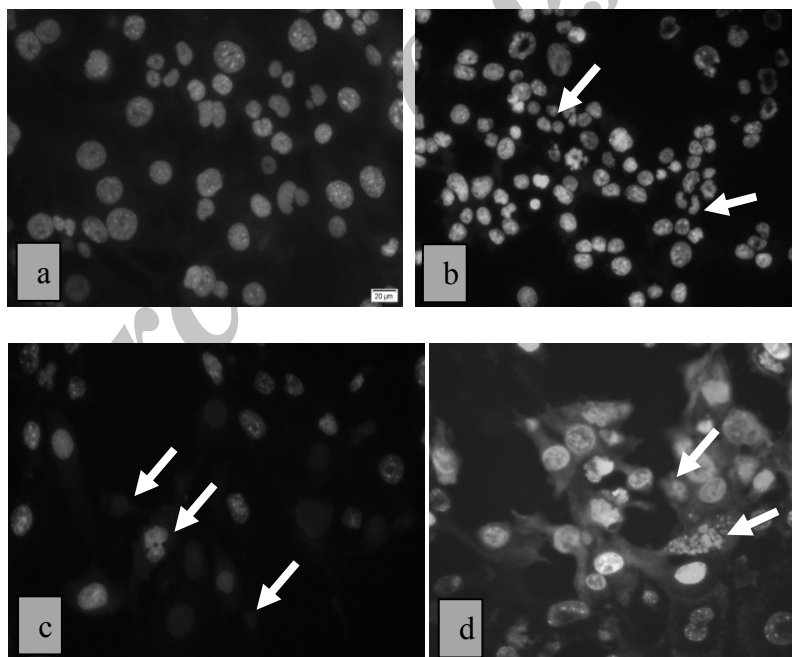


نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین درصد حیات سلول‌های سرطانی تحت تأثیر تاکسول به تنهایی و در ترکیب با عصاره متانولی ریشه شیرین بیان (رنگ‌سنجی MTT) پس از ۴۸ ساعت تیمار (t-test, $p < 0.05$; Error bars: Std. Error)





نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین درصد حیات سلول‌های سرطانی تحت تأثیر تاکسول به تنهایی و در ترکیب با عصاره متانولی ریشه شیرین بیان (رنگ‌سنجی MTT) پس از ۷۲ ساعت تیمار (t-test, p<0.05; Error bars: Std. Error)



شکل شماره ۱- رنگ‌آمیزی فلورسنت سلول‌های سرطانی رده 4T1 تیمار شده با ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و ۲۰ نانومولار تاکسول برای مدت زمان ۴۸ ساعت. (a) سلول‌های کنترل رنگ‌آمیزی شده با هوست. (b) سلول‌های تیمار شده با عصاره متانولی ریشه شیرین بیان) رنگ‌آمیزی شده با هوست نشان دهنده تغییر شکل و متراکم شدن هسته‌ها. (c) سلول‌های تیمار شده با عصاره متانولی ریشه شیرین بیان) رنگ‌آمیزی همزمان هوست و پروپیدیم آبوداید نشان دهنده سلول‌های زنده (آبی) و سلول‌های مرده (قرمز). (d) سلول‌های تیمار شده با تاکسول، رنگ‌آمیزی همزمان هوست و پروپیدیم آبوداید نشان دهنده فروپاشی و متراکم شدن هسته‌ها

بحث

می‌شود [۲۲]. لازم به ذکر است رده سلولی 4T1، رسپتور استروژن مثبت (ER-positive) می‌باشد [۲۳].

گلابریدین موجود در عصاره فعالیت وابسته به رسپتورهای استروژن را از خود نشان می‌دهد و در غلظت‌های ۱۰ nM تا ۱۰ μM اثر تشدید رشد دارد. گلابریدین رنج غلظت‌های بسیار منحصر به فردی برای فعالیت‌های نشان می‌دهد: فعال‌سازی مختصری از رشد سلول در غلظت ۱ μM، در حالی که ماکسیمم سطح تحریک در ۱۰ μM مشاهده شده است و از همه مهم‌تر فعالیت ضد تکثیری یا آپوپتوتیک گلابریدین در غلظت‌های ۱۵ μM > شناسایی شده است [۲۴].

ایزولیکوئیریتینین (isoliquiritigenin)، یکی دیگر از ترکیبات عصاره است که فعالیت ضد سرطانی در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌های سرطان پستان نشان می‌دهد. این ترکیب در غلظت‌های پایین اثرات پیشبرد رشد وابسته به رسپتورهای استروژن α از خود نشان می‌دهد [۲۵، ۲۶]. تحقیقات Dong و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که عصاره ریشه شیرین بیان رشد سلول‌ها را در محدوده ۱۰۰ μg/ml - ۰/۱ تحریک می‌کند، ماکسیمم سطح تحریک در ۱۰ μg/ml گزارش شده است. اگرچه گلابریدین ممکن است در فعالیت استروژنیک عصاره شرکت کند، ولی فعالیت ضد تکثیری آن به وسیله دیگر ترکیبات موجود در عصاره تنظیم می‌شود. در واقع فعالیت استروژنیک عصاره در نتیجه همکاری ترکیبات عصاره مانند گلیسیریزین، گلابریدین، ایزولیکوئیریتینین، گلابرین و ژنیستین می‌باشد که فعالیت ضد تکثیری (در غلظت‌های بالا) یا پیشبرد رشد (در غلظت‌های پایین) عصاره می‌تواند به وسیله همکاری ترکیبات دیگر تنظیم شود [۲۷]. در این پژوهش نیز دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره نسبت به گروه کنترل سبب تحریک رشد سلول‌ها شدند که این اثر را می‌توان با توجه به موارد ذکر شده توجیه کرد.

آنژیوژنز فرایند با اهمیتی است که در تعامل با سلول‌های سرطانی سبب پیشبرد رشد، تهاجم و متاستاز می‌شود. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و MTA1 (پروتئین مرتبط با متاستاز) نقش عمده‌ای در رگ‌زایی ایفا می‌کنند. اخیراً فعالیت

گیاه شیرین بیان به عنوان یک گیاه دارویی با اهمیت از زمان‌های قدیم شناخته شده است. تحقیقات نشان داده است که، عصاره تام ریزوم شیرین بیان به صورت وابسته به دوز سبب کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها می‌شود و همچنین به صورت وابسته به دوز دارای سمیت سلولی است [۱۸]. این عصاره همچنین می‌تواند سبب مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد شود [۱۵]. عصاره ریشه شیرین بیان فسفریلاسیون Bcl-2 را القا می‌کند و همانند تاکسول سبب توقف سیکل سلولی در فاز G2/M در رده‌های سلولی توموری می‌شود [۹].

ترکیبات موجود در عصاره ریشه شیرین بیان در فعالیت‌های سلولی دخیل هستند. گلیسیریزین یک گلیکوزید تری‌ترین است که ترکیب اصلی در عصاره ریشه شیرین بیان می‌باشد و خواص فارماکولوژیکی وسیعی از آن گزارش شده است، برای مثال: ضد التهاب، ضد تومور و ضد ویروس [۱۹]. گلیسیریزین به عنوان یک عامل ضد تکثیری علیه سلول‌های توموری عمل کرده و آپوپتوز را القا می‌کند [۲۰]. همچنین این ترکیب دارای پتانسیل درمانی علیه سرطان پروستات می‌باشد [۲۱].

در این تحقیق نیز بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و رنگ‌سنجی MTT نشان داد که عصاره متانولی شیرین بیان و تاکسول موجب کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. نتایج به دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تأیید نمودند.

گلابریدین یک ترکیب فیتواستروژن موجود در عصاره ریشه شیرین بیان می‌باشد که اثرات آن به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. به طور کلی مطالعات نشان داده است که دوز پایین این ترکیبات رشد سلول‌های سرطان پستان رده‌های MCF-7 و T-47D (ER+) را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می‌کند، ولی در رده‌های سلولی MDA-MB231/435 که رسپتور استروژن منفی هستند (ER-) این تحریک رشد صورت نمی‌گیرد. اما در غلظت‌های بالا، رشد هر دو نوع رده سلولی (رسپتور استروژن مثبت و منفی) مهار



سرطان پستان سبب مهار آپوپتوز، افزایش آنژیوژنز، افزایش قدرت مهاجمی می‌شود [۳۳]. در سال ۲۰۱۰، کاور (Kaur) و همکاران ترکیبات ریزوم شیرین‌بیان را جدا کرده و فعالیت مهارکنندگی آنها را بر روی آنزیم COX-2 مورد بررسی قرار دادند و یافته‌های آنها بدین شرح بود: ایزولیکوئیرتین ۸۹/۰۳، کامفرول ۹۷/۰۸، گلیسیریزیک اسید ۹۵/۸ درصد مهار آنزیم COX-2 را نشان دادند. به علاوه گلیسیریزیک اسید بیشترین مهارکنندگی انتخابی را در میان ترکیبات جدا شده از شیرین‌بیان داشت [۳۴]. پس شاید بتوان مکانیسم‌هایی که به موجب آن عصاره ریشه شیرین‌بیان سبب افزایش سایتوتوکسیسیتهی تاکسول در سلول‌های سرطانی می‌شود را ناشی از همین اثرات دانست.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که عصاره متانولی ریشه شیرین‌بیان اثر مهاری بر توان زیستی سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 دارد و اثر سایتوتوکسیک عصاره ریشه شیرین‌بیان بر سلول‌های سرطانی وابسته به دوز و زمان بوده است. همچنین این تحقیق نشان داد که عصاره متانولی ریشه شیرین‌بیان سبب متراکم شدن، فروپاشی و تغییر شکل هسته سلول‌های تیمار شده با عصاره می‌شود که وجود این تغییرات مورفولوژیک از علائم رخداد آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که اثر ضد سرطانی عصاره ریشه شیرین‌بیان در موش صحرایی مبتلا به سرطان پستان بررسی شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کرج جهت همکاری در اجرای طرح و همچنین از جناب آقای دکتر حسن نظریان از مرکز عالی کشاورزی امام خمینی کرج به منظور شناسایی گیاه شیرین‌بیان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

ضدتوموری و ضد آنژیوژنزی عصاره ریشه شیرین‌بیان را بر دو فاکتور VEGF و MTA1 در سلول‌های سرطانی سنجیده و به این نتیجه رسیده‌اند که، عصاره می‌تواند در کاهش VEGF و MTA1 القاکننده تکثیر سلولی مؤثر باشد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره ریشه شیرین‌بیان می‌تواند منبع مکمل بالقوه‌ای برای درمان سرطان باشد [۲۸].

تحقیق حاضر نشان داد که استفاده همزمان تاکسول و عصاره متانولی ریشه شیرین‌بیان، اثرات سایتوتوکسیک تاکسول را در سطح معنی‌داری افزایش می‌دهد (البته همان طور که در نمودار مشخص است در دو غلظت ترکیبی اول و دوم به علت تحریک رشد سلول‌ها توسط عصاره، تأثیر تاکسول کاهش پیدا کرده است). استفاده از گلیسیریزین قبل از تیمار با عامل‌های ضد سرطانی سبب افزایش جذب این عوامل می‌شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ بر رده سلولی MCF-7 انجام گرفت، مشخص شد گلیسیریزین عمل مهاری تقسیم سلولی عامل ضد سرطانی تاکسول را تشدید می‌کند [۲۹]. شیمی درمانی، یکی از مؤثرترین درمان‌ها برای تومورها به شمار می‌رود. از طرفی یکی از مشکلات در درمان بیماران مبتلا به سرطان، مقاومت دارویی است. مهم‌ترین شکل مقاومت، مقاومت چند دارویی است که از نظر کلینیکی باعث افزایش تولید گروهی از گلیکوپروتئین‌های پل زنده در غشا به نام گلیکوپروتئین‌های p می‌شود که به شکل پمپ وابسته به انرژی، دفع داروهای داخل سلول را شتاب می‌دهد [۳۰]. اسید گلیسیرتینیک (glycyrrhetic acid) و گلابریدین در عصاره شیرین‌بیان، اثرات مهاری بر روی گلیکوپروتئین p انسان نشان داده‌اند و ممکن است برای افزایش اثر شیمی درمانی سرطان مؤثر واقع شوند [۳۱]. در بسیاری از تومورهای انسانی بیان EGFR افزایش می‌یابد و این افزایش با مهاجم، آنژیوژنز و مقاومت به داروهای شیمی درمانی مرتبط است. گلیسیریزیک اسید موجود در شیرین‌بیان پروتئین کیناز C را مهار می‌کند و باعث کاهش بیان EGF (فاکتور رشد اپیدرمال) می‌شود [۳۲]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سطح آنزیم COX-2 در بعضی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان بالا می‌رود. این آنزیم در



1. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2013.
2. Subramaniam E, Liung TK, Mashor Y and Ashidi Mat Isa N. Breast Cancer Diagnosis Systems. *International Journal of the Computer, the Internet and Management* 2006; 14 (2): 24 - 35.
3. Lester Sc. The breast In: Kumar V, Abbas AK and Fausto N. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Elsevier Saunders 2005, pp: 1119 - 54.
4. Heinig U and Jennewein S. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African Journal of Biotechnol.* 2009; 8: 1370 - 85.
5. Jennewein S and Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57: 13 - 9.
6. Mohammadi-Motlagh HR, Mansouri K and Mostafaie A. Plants as useful agents for angiogenesis and tumor growth prevention. *Physiol. and Pharmacol.* 2010; 14: 297 - 312.
7. Sharma M and Govind P. Ethnomedicinal plants for prevention and treatment of tumors. *International Journal of Green Pharmacy* 2009; 2 - 5.
8. Samy RP, Gopalakrishnakone P and Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 164: 1 - 14.
9. Harwansh RK, Patra KC, Pareta SK, Singh J and Biswas R. Pharmacological studies on *Glycyrrhiza glabra*. *Pharmacologyonline* 2011; 2: 1032 - 8.
10. Visput SH and khopade A. *GLYCYRRHIZA GLABRA* Linn.- "KLITAKA". *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2011; 2: 42 - 51.
11. Anagha K, Manasi D, Priya L and Meera M. Pharmacological studies of Yashtimadhu (*Glycyrrhiza glabra* L.) in various animal models. *Global J. Res. Med. Plants & Indigen* 2013; 2: 152 - 64.
12. Bolouri Moghaddam E, Hemmati Kh, Bashiri Sadr Z and Mashayekhi K. Effect of harvest time and root diameter on glycyrrhizin content in *Glycyrrhiza glabra*. *Journal of Plant Production* 2009; 16: 29 - 45.
13. PDR for Herbal Medicines. 3th ed. Thomson PDR. Montvale 2004, pp: 876 - 7.
14. Isbrucker RA and Burdock GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology* 2006; 46: 167 - 92.
15. Sultana SH, Haque A, Hamid K, Urmi KF and Roy S. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2010; 1: 957 - 60.
16. Senthil Raja M, Khan I, Perumal P, Srikakolapu SR and Gotteti SD. Quantitative analysis of glycyrrhizic acid in crude drug and its herbal formulation by UV spectrophotometry. *Appl. Sci. Res.* 2010; 2: 184 - 9.
17. Martin J. Stoddart (ed), Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecula Biology 2011.
18. Aghel N, Khodadadi A and Esmaelian M. Cytotoxic and inhibitory effects of glycyrrhiza glabra and matricaria aurea extracts on metalloproteinase matrix activity in comparison with steroidal and non steroidal compounds in fibrosarcoma cell line culture. *Urmia Medical Journal* 2008; 19: 132 - 8.



19. Baltina LA. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 155 - 71.
20. Rossi T. Selectivity of action of glycyrrhizin derivatives on the growth of MCF-7 and HEP-2 cells. *Anticancer Res.* 2003; 23: 3813 - 8.
21. Thirugnanam S. Apoptosis in prostate cancer cell lines. *Oncology Reports* 2008; 20: 1387 - 92.
22. Rice S and Whitehead SA. Phytoestrogens and breast cancer promoters or protectors? *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13: 995 – 1015.
23. Lirdprapamongkol K. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 25: 57 - 65.
24. Tamir S, Eizenberg M and Somjen D. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 5704 - 9.
25. Maggiolini M, Statti G, Vivacqua A, Gabriele S, Rago V, Loizzo M, Menichini F and Amdo S. Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002; 82: 315 - 22.
26. Kanazawa M, Satomi Y, Mizutani Y, Ukimura O, Kawauchi A, Sakai T, Baba M, Okuyama T, Nishino H and Miki T. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. *Eur. Urol.* 2002; 43: 580 - 6.
27. Dong S, Inoue A, Zhu Y, Tanji M and Kiyama R. Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of *Glycyrrhiza glabra* root. *Food and Chemical Toxicol.* 2007; 45: 2470 - 8.
28. Nagaraj SRM, Lingaraj SM, Balaraju Y, Kumar A and Salimath BP. MTA1 induced angiogenesis, migration and tumor growth is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *IOSR Journal of Pharmacy* 2012; 2: 34 - 43.
29. Dudhatra GH. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *The Scientific World Journal* 2012, pp: 1 - 33.
30. Waring MJ and Ponder BAJ. The search for new anticancer drugs. Kluwer Academic Publishers 1992.
31. Nabekura T, Yamaki T, Ueno K and Kitagawa S. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 by dietary phytochemicals. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008; 62: 867 - 73.
32. Sagar SM, Yance D and Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-part 2. *Current Oncology* 2006; 13: 99 - 107.
33. Divvela AKC, Challa RS and Tagaram IK. Pathogenic role of cyclooxygenase-2 in cancer. *Journal of Health Science* 2010; 56: 502 - 16.
34. Kaur P, Kaur S, Kumar S and Singh P. *Rubia cordifolia* L. and *Glycyrrhiza glabra* L. medicinal plants as potential source of COX-2 inhibitors. *Am. J. Biomed. Sci.* 2010; 2: 108 -20.

