

## اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶

سهیلا خضرای مرادیان<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا عندلیب<sup>۲</sup>، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی<sup>۳</sup>، زهره سفری<sup>۴</sup>،  
احد زارع<sup>۵</sup>، دکتر غلامعلی کاردر<sup>۶</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سرطان‌های دستگاه گوارش به خصوص روده‌ی بزرگ یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع غربی است. به دلیل تغییر الگوی تغذیه‌ای در جوامع در حال توسعه نیز، این گونه سرطان‌ها در حال افزایش است. امروزه استفاده از طب گیاهی و مکمل، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. شیرین بیان یک گیاه باستانی در طب گیاهی است که بسیاری از خواص درمانی مانند اثر ضد سرطان و ضد التهابی، برای آن ذکر شده است. در این مطالعه، اثر عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رده‌ی سلولی سرطان روده‌ی بزرگ انسانی (HT-۲۹) و سرطان روده‌ی بزرگ موشی (CT-۲۶) در مقایسه با سلول‌های طبیعی (HEK293) بررسی شده است.

**روش‌ها:** ابتدا عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان پس از آسیاب کردن ریشه‌ی خشک آن در بافر فسفات سالین (PBS) در دمای اتاق تهیه گردید. پس از دیالیز در همین بافر، غلظت پروتئینی آن به روش برادفورد تعیین گردید. رده‌های سلولی HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C، توسط غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μg/ml عصاره‌ی شیرین بیان تیمار شدند. سمیت سلولی غلظت‌های مختلف شیرین بیان با استفاده از روش MTT بررسی شد. در ادامه، بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با استفاده از سیستم فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** غلظت‌هایی تا ۱۰۰ μg/ml عصاره‌ی پروتئینی، برای تکثیر سلول‌های طبیعی سمی نیستند. در حالی که توان زیستی (Viability) رده‌های سلولی CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ به ترتیب تا ۲۹/۳، ۴۲/۵ و ۷۰/۰ درصد به روش MTT اندازه‌گیری شدند. به علاوه، روش سنجش آپوپتوز با فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ که با غلظت ۱۰۰ μg/ml عصاره‌ی پروتئینی تیمار شده بودند، به ترتیب به میزان ۴۷/۷۲ ± ۸/۰۰ (P = ۰/۰۲۶)، ۳۴/۹۳ ± ۸/۲۱ (P = ۰/۰۵۶) و ۱۷/۵۰ ± ۶/۵۰ (P = ۰/۰۷۰) روی سلول‌های سرطانی اثرات مهار کنندگی رشد داشتند و همچنین موجب برانگیختن آپوپتوز در آن‌ها شدند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان به عنوان یک داروی مکمل برای مهار رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ مناسب باشد ضمن این که برای تأیید آن، مطالعه‌ی رده‌های سلولی بیشتر مورد نیاز است.

**واژگان کلیدی:** شیرین بیان، آپوپتوز، سرطان روده‌ی بزرگ

**ارجاع:** خضرای مرادیان سهیلا، عندلیب علیرضا، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، سفری زهره، زارع احد، کاردر غلامعلی. اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ؟؟

- ۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۶- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: gakardar@tums.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر غلامعلی کاردر

## مقدمه

بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان را می‌توان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان به شمار آورد. سرطان‌های دستگاه گوارش به خصوص روده‌ی بزرگ یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع غربی است و به دلیل تغییر الگوی تغذیه‌ای در جوامع در حال توسعه نیز، این گونه سرطان‌ها در حال افزایش است؛ به طوری که سومین سرطان شایع در مردان و زنان می‌باشد (۱). روش‌های مختلفی برای درمان سرطان روده‌ی بزرگ مانند جراحی، شیمی‌درمانی و ایمونوتراپی معرفی شده‌اند، اما هیچ کدام توفیق قابل توجهی در این امر نداشته‌اند و بیشتر این روش‌ها تنها در به تأخیر انداختن رشد آن مؤثر بودند (۲).

در سال‌های اخیر، به دلیل عوارض جانبی نامطلوب ترکیبات سنتتیک دارویی به خصوص در داروهای شیمی‌درمانی، تمایل به سمت مصرف گیاهان دارویی بیشتر شده است (۳). شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* از خانواده‌ی *Papilionaceae* گیاه بومی منطقه‌ی مدیترانه است و در اکثر نقاط کشور به خصوص در فارس و لرستان می‌روید. فرآورده‌های دارویی به دست آمده از شیرین بیان از ریشه‌ها و ساقه‌های زیرزمینی گیاه فراهم می‌آیند. این گیاه اثرات گسترده‌ی فارماکولوژیکی دارد که از آن جمله می‌توان به اثرات ضد التهاب، ضد سرطان، خواب‌آور، ضد سرفه، محافظ کبد، درمان زخم، ضد سم، ضد آلرژی، درمان کننده‌ی هپاتیت ویروسی و تنظیم کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی اشاره کرد (۴-۱۱).

بخش عمده‌ای از فعالیت‌های اشاره شده از عصاره‌ی گیاه شیرین بیان را به آگیلیکون ساپونی بتا

گلیسرینیک اسید نسبت می‌دهند که ساختمان شبه استروئیدی دارد و مشتق سنتتیک آن در درمان زخم معده و دوازدهه مطرح است (۶). عصاره‌ی این گیاه حاوی ترکیب گلیسریریزین یا اسید گلیسریریزیک و نمک‌های پتاسیم و کلسیم است. اسید گلیسریریزیک و گلیسریریزین برای درمان زخم‌های گوارشی مفید است و مقدار آن با توجه به شرایط محیطی و گونه‌ی گیاه ۲۰-۵ درصد می‌باشد. ریشه‌های این گیاه حاوی کومارین، فلاون، روغن‌های فرار و استرول گیاهی نیز هست. همچنین ریشه‌ی شیرین بیان، دارای گلوکز، ساکاروز، آسپارژین، رزین و کمی اسانس می‌باشد (۱۲).

بررسی‌ها نشان داده است ترکیبات غیر پروتئینی موجود در ریشه‌ی گیاه شیرین بیان مانند ترکیبات اتانولی، فنلی، فلاونوئیدی و پلی ساکاریدی، موجب آپوپتوز سلولی می‌شوند و در نتیجه می‌توانند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند. همچنین مطالعات بسیاری بر اثر انتخابی این ترکیبات بر روی سلول‌های سرطانی از طریق برانگیختن آپوپتوز انجام شده است (۱۳-۱۶).

آپوپتوز یک مرگ طبیعی در شرایط فیزیکی و توسعه‌ی ارگان‌های سلولی است و موجب تغییراتی در مورفولوژی سلول‌ها مانند متورم شدن غشای سلول‌ها، متراکم شدن کروماتین، فعالیت کاسپازها و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شود (۱۷).

با توجه به این که هنوز مطالعه‌ای در مورد اثر ترکیبات پروتئینی این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی صورت نگرفته بود، در این مطالعه اثر عصاره‌ی پروتئینی گیاه شیرین بیان بر روی مهار رشد رده‌های سلولی سرطان روده‌ی بزرگ (HT-۲۹) و (CT-۲۶) بررسی شد.

## روش‌ها

## ۱- نحوه‌ی عصاره‌گیری

ریشه‌ی خشک شیرین بیان توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. ۱۵ g شیرین بیان با ۵۰ ml محلول فسفات سالین (PBS) (۰/۲ M، ۰/۴ pH) مخلوط گردید. پس از ۴۸ ساعت، توسط سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی در بافر PBS یک شب دیالیز (کیسه‌ی دیالیز با منافذ ۱۴ KDa، Sigma) شد و به این ترتیب، مواد زاید و ناخواسته‌ای از جمله مواد سلولزی و پوسته‌های سلولی و مواد غیر پروتئینی از عصاره حذف گردید و محلولی قهوه‌ای رنگ حاصل شد. این محلول برای استفاده‌های بعدی در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. غلظت پروتئین‌های محلول به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

## ۲- الکتروفورز عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان

به کمک الکتروفورز به روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) باندهای مختلف پروتئینی شیرین بیان به دست آمد. به این ترتیب که پس از آماده‌سازی ژل، ۳۰  $\mu\text{l}$  از عصاره‌ی PBS شیرین بیان با ۵۰  $\mu\text{l}$  بافر نمونه، مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای حدود  $100^{\circ}\text{C}$  جوشانده شد. سپس نمونه‌ها و نشانگر پروتئینی درون چاهک‌های ژل منتقل شدند. ولتاژ در ساعت اول انجام آزمون، ۶۰ V و پس از نفوذ نمونه به درون ژل پایین (ژل ۷/۵ درصد)، ولتاژ تا ۱۷۰ V افزایش یافت. زمان انجام آزمون حدود ۴ ساعت بود. سپس ژل با استفاده از رنگ کوماسی بلو R-۳۵۰ رنگ‌آمیزی شد. برای رنگ‌بری و از بین بردن رنگ‌های اضافی، از رنگ‌بر حاوی آب، متانل و

اسید استیک استفاده شد. میزان حرکت نسبی باندها (RM = Relative mobility) از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید و با استفاده از باندهای مربوط به نشانگر پروتئینی (PageRuler prestained protein ladder, Thermo scientific)، وزن مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز با قرار دادن حرکت نسبی در نمودار به دست آمد.

$$RM = \frac{\text{مسافت طی شده پروتئین از مبدا}}{\text{مسافت طی شده رنگ از مبدا}}$$

## ۳- کشت سلولی

رده‌ی سلولی آدنوکارسینوما‌ی روده‌ی بزرگ انسانی (HT-۲۹)، رده‌ی سرطانی روده‌ی بزرگ موشی (CT-۲۶) و سلول‌های HEK-۲۹۳ (به عنوان شاهد طبیعی) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS یا) در فلاسک کشت سلولی  $\text{cm}^2$  ۲۵ (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{CO}_2$  ۵ درصد کشت داده شدند.

## ۴- بررسی تیمار و سمیت عصاره‌ی شیرین بیان با

## روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیم به فورمازان نامحلول بنا شده است. جهت انجام آزمایش، سلول‌های HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه  $4 \times 10^3$  سلول در حجم  $150 \mu\text{l}$  محیط DMEM کشت داده شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد صفر فقط  $150 \mu\text{l}$  محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد.

دوباره به آن برگردانده شد تا تریپسین خشتی گردد. سلول‌ها به وسیله‌ی سمپلر از هر خانه جمع شدند و به منظور شستشوی سلول‌های موجود، لوله‌های اپندرف به مدت ۵ دقیقه و با دور ۲۲۰۰ سانتریفوژ گردید.

سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی باقی مانده، PBS سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۲۰۰ سانتریفوژ گردید. در لوله‌ای جداگانه، ۱۵  $\mu\text{l}$  انکسین  $\text{Incubation buffer } 1 \text{ ml} + \text{PI } 20 \mu\text{l} + \text{V}$  با یکدیگر مخلوط شدند. پس از حذف مایع رویی، به رسوب سلولی ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از محلول آماده شده، اضافه گردید. پس از پیپتاژ کافی، نمونه‌ها در لوله‌های مخصوص دستگاه فلوسایتومتری تخلیه شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز گردیدند. همچنین یک لوله، برای شاهد مثبت در نظر گرفته شد که باید بیشترین مقدار آپوپتوز را نشان می‌داد. به این صورت که بعد از جمع‌آوری سلول‌ها و شستشو با PBS، ۵۰۰  $\mu\text{l}$  فرمالدئید ۳ درصد به آن اضافه گردید و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن تمامی مراحل پیش گفته برای رنگ‌آمیزی آن تکرار شد.

یک لوله نیز برای شاهد منفی به کار گرفته شد که در آن، تنها سلول‌های شستشو شده با PBS بدون هیچ رنگ‌آمیزی وجود داشت که مقدار اتوفلورسانس دستگاه را نشان می‌داد.

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) و با کمک مشاور آمار، اطلاعات مربوط به توان سلولی و آپوپتوز رده‌های سلولی مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در  $37^{\circ}\text{C}$ ، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵  $\mu\text{g/ml}$ ، ۵۰ و ۱۰۰ عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان تیمار شدند. از محلول MTT (۵ mg/ml)، ۲۰  $\mu\text{l}$  در هر خانه ریخته شد. بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ، محلول رویی حذف و ۱۵۰  $\mu\text{l}$  حلال MTT (۱۵ ml ایزوپروپانول و ۲۰  $\mu\text{l}$  HCl) اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، توسط دستگاه خوانش الایزا جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۰ nm اندازه‌گیری شد. همه‌ی آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شد.

#### ۵- بررسی وقوع آپوپتوز سلولی به وسیله‌ی فلوسایتومتری

در این آزمون از کیت (Roche, Germany) Annexin-V-FLUOS استفاده شد. به منظور بررسی آپوپتوز، سلول‌های HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در پلیت ۲۴ تایی کشت داده شدند. در هر خانه  $4 \times 10^4$  سلول در ۱ ml محیط DMEM سردار کشت استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در  $37^{\circ}\text{C}$ ، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵  $\mu\text{g/ml}$ ، ۵۰ و ۱۰۰ عصاره‌ی شیرین بیان تیمار شدند و برای هر سلول، ۳ خانه به عنوان شاهد صفر در نظر گرفته شد که فاقد هر گونه عصاره و فقط حاوی محیط کشت و سلول مورد نظر بود. همه‌ی آزمون‌ها به صورت سه تایی انجام شد.

به منظور ارزیابی آپوپتوز، در ابتدا توسط سر سمپلر استریل، محتویات چاهک‌های پلیت کشت سلولی مورد نظر برداشته شد و در لوله‌های اپندرف استریل با حجم ۱/۵ cc تخلیه گردید. سپس ۵۰  $\mu\text{l}$  تریپسین به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از گذشت چند دقیقه، محیط کشت جمع شده از هر چاهک

## یافته‌ها

## نتایج آزمایش MTT

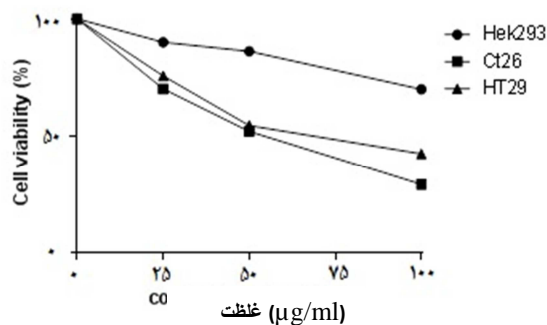
بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان، رشد سلول‌های HT-۲۹ و CT-۲۶ را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهند. در تفسیر نتایج این آزمایش، میزان جذب نوری (OD یا Optical density) نمونه‌های مربوط به دوز صفر (سلول‌های تیمار نشده که به عنوان شاهد منفی استفاده شدند)، به عنوان توان زیستی (Viability) ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و با مقایسه‌ی OD سایر دوزهای مورد استفاده‌ی عصاره با دوز صفر عصاره، اختلاف بین اثر دوزهای مختلف عصاره محاسبه گردید.

نتایج مقایسه‌ی دوزهای مختلف عصاره بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز تیماری عصاره، توان زیستی سلول‌ها کاهش نشان داد. با توجه به شکل ۱، غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  عصاره، اثر کمی بر سلول‌های طبیعی دارد. در حالی که در سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، باعث کاهش قابل توجه رشد شده است.

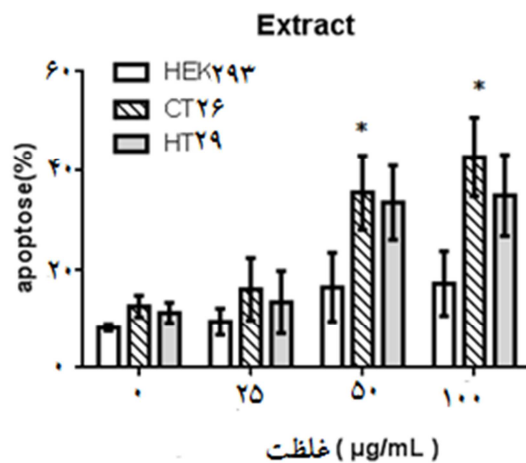
## بررسی نتایج آپوپتوز به روش فلوسایتومتری

نتایج مقایسه‌ی دوزهای مختلف عصاره بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز عصاره، آپوپتوزیس افزایش یافت. به عنوان شاهد صفر، از سلول‌های همان رده‌ی سلولی که با عصاره تیمار نشده بودند، استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ آمده است، دوز ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  عصاره، تأثیر چندانی

بر روی سلول‌ها ندارد. در حالی که دوز ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  عصاره، به طور معنی‌داری موجب القای آپوپتوز، در سلول‌های CT-۲۶ شد ( $P < ۰/۰۵۰$ ). غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  عصاره، بیشترین اثر مهاری را داشت که در مقایسه با گروه شاهد، اثر مهاری آن معنی‌دار بود (شکل ۲) ( $P = ۰/۰۲۶$ : CT-۲۶،  $P = ۰/۰۵۶$ : HT-۲۹).



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان بر رده‌های سلولی سرطانی (HT-۲۹ و CT-۲۶) و رده‌ی سلولی طبیعی (HEK-۲۹۳) به روش MTT



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان بر مهار رشد سلول‌های CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ در مقایسه با شاهد صفر به روش فلوسایتومتری. نمودارهای ستون نشان دهنده‌ی میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. \*  $P < ۰/۰۵۰$  معنی‌دار بود.

مطالعات دیگری نیز بر روی اثرات ضد سرطانی ترکیبات پلی‌ساکاریدی موجود در این گیاه صورت گرفته است (۱۰). بررسی اثرات عصاره‌ی اتانولی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان بر روی تکثیر سلولی و آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطان پستان MCF-۷ نشان داده است که این عصاره موجب جلوگیری از رشد این سلول‌ها در مرحله‌ی G<sub>1</sub> و برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است (۱۰).

گزارش‌ها نشان داده است که فلاونوئید موجود در شیرین بیان، اثر ضد کارسینوژنیک دارد. این مولکول باعث آپوپتوز در سلول‌های هیپاتوما و ملانوما شده است (۲۰-۲۱). همچنین عصاره‌ی متانولی این گیاه موجب جلوگیری از رشد سلول‌های لوسمی مونوبلاستی و برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است. در شیرین بیان، ترکیب ۴, ۲, ۴ تری هیدروکسی کالکون (ایزولیکو رتیجین) با اثر حفاظتی در دوزهای مختلف موجب کاهش توان زیستی و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطان پروستات در موش و انسان شده است. فلاونوئیدها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در این گیاه، جزء عوامل شیمی درمانی هستند که به نظر می‌رسد چرخه‌ی رشد سلول‌های توموری را در چند هدف مورد تهاجم قرار می‌دهند (۱۵).

میزان آپوپتوز هر کدام از رده‌های سلولی در جدول ۱ درج شده است.

### بحث

اثرات گیاهان مختلف بر روی سرطان بررسی شده است، به عنوان مثال در مطالعه‌ی نشان داده شد که عصاره‌ی سیر خام، منجر به بیان ژن کاسپاز ۳ و در نتیجه موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ در رده‌ی سلولی COLO-۲۰۵ شد (۱۸). در مطالعه‌ی دیگری عصاره‌ی برگ زیتون با توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله‌ی G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> موجب مهار سرطان سینه در رده‌ی سلولی MCF-۷ گردیده است (۱۹).

بررسی‌ها نشان داده است که ترکیبات غیر پروتئینی موجود در ریشه‌ی گیاه شیرین بیان مانند ترکیبات اتانولی، فنلی، فلاونوئیدی و پلی‌ساکاریدی، موجب آپوپتوز سلولی می‌شوند. در نتیجه، می‌توانند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند (۱۶-۱۳). اثرات عصاره‌ی اتانولی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان بر روی آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطان پستان بررسی و مشاهده شده است که این عصاره موجب برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است (۱۴).

جدول ۱. میانگین آپوپتوز رده‌های سلولی مورد مطالعه بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان

۱۰۰ µg/ml	۵۰ µg/ml	۲۵ µg/ml	۰ µg/ml	رده‌ی سلولی
۱۷/۱۵ ± ۶/۵۰	۱۶/۳۶ ± ۸/۰۰	۹/۳۷ ± ۲/۷۹	۸/۲۰ ± ۰/۷۰	HEK-۲۹۳
P = ۰/۰۷۰	P = ۰/۴۳۹	P = ۰/۴۰۲		مقدار P
۴۷/۷۲ ± ۸/۰۰	۳۵/۵۲ ± ۷/۵۰	۱۵/۹۷ ± ۶/۳۰	۱۲/۵۰ ± ۲/۲۳	CT-۲۶
P = ۰/۰۲۶	P = ۰/۰۴۸	P = ۰/۶۲۳		مقدار P
۳۴/۹۳ ± ۸/۲۱	۳۳/۴۷ ± ۷/۵۰	۱۳/۳۶ ± ۶/۳۰	۱۱/۲۰ ± ۲/۰۸	HT-۲۹
P = ۰/۰۵۶	P = ۰/۰۶۱	P = ۰/۶۱۱		مقدار P

میانگین ± انحراف معیار و مقدار P مقایسه‌ی هر یک از شرایط نسبت به شاهد صفر است.

نشان می‌دهند. احتمال می‌رود این نتیجه به دلیل اختلاف اثر عصاره، بر روی رده‌ی سلولی انسانی و موشی است و به نظر می‌رسد که بر رده‌ی موشی، اثر قوی‌تری دارد. از این رو با مطالعه‌ی حیوانی این عصاره‌ها، در صورت اثربخشی در مدل موشی، شاید بتوان به اثربخشی در انسان هم امیدوار بود. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان به عنوان یک داروی مکمل برای مهار رشد سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ مناسب باشد. ضمن این که برای تأیید این مطالعه، رده‌های سلولی بیشتری مورد نیاز است.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از تمام کسانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. تمامی هزینه‌های انجام این پژوهش در قالب یک طرح پژوهشی مصوب، توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان پرداخت شده است.

در مطالعه‌ی Jung و همکاران (۱۵) و نیز Tomoda و همکاران (۲۲) فراکشن‌های به دست آمده از پلی‌ساکاریدهای ریشه‌ی شیرین بیان باعث فعال شدن ماکروفاژها شده است و همچنین اثر تنظیمی این مولکول بر روی عامل رونویسی هسته‌ای (AP-۱) بررسی گردیده است که این پروتئین موجب مهار پروموتور القایی تومور و در نتیجه باعث مهار دگرگونی (Transformation) سلولی می‌شود (۲۳). همچنین اثر یک پلی‌فنل جدید موجود در ریشه‌ی شیرین بیان بر روی آپوپتوز و جلوگیری از رشد سلول در مرحله‌ی G<sub>۲</sub>/M و فسفوریلاسیون bcl<sub>۲</sub> سلول‌های توموری بررسی گردیده است (۱۳).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان در غلظت‌های مورد استفاده موجب مهار رشد سلول‌های هر دو رده‌ی سرطانی می‌شود؛ در حالی که تأثیر اندکی بر روی سلول‌های طبیعی داشت. مقایسه‌ی رده‌ی سلول‌های HT-۲۹ و CT-۲۶ با یکدیگر نشان داد که سلول‌های CT-۲۶ به دوز ۱۰۰ μg عصاره حساس‌ترند و مقاومت کمتری

### References

- Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009; 22(4): 191-7.
- Khan R, Khan AQ, Lateef A, Rehman MU, Tahir M, Ali F, et al. Glycyrrhizic Acid Suppresses the Development of Precancerous Lesions via Regulating the Hyperproliferation, Inflammation, Angiogenesis and Apoptosis in the Colon of Wistar Rats. PLoS ONE 2013; 8(2): e56020.
- Tai CJ, Wang WC, Wang CK, Wu CH, Yang MD, Chang YJ, et al. Fermented Wheat Germ Extract Induced Cell Death and Enhanced Cytotoxicity of Cisplatin and 5-Fluorouracil on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 121725.
- Turpie AG, Thomson TJ. Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference to side-effects. Gut 1965; 6(6): 591-4.
- Wang GS, Han ZW. The protective action of glycyrrhiza flavonoids against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. Yao Xue Xue Bao 1993; 28(8): 572-6.
- Kroes BH, Beukelman CJ, van den Berg AJ, Wolbink GJ, van DH, Labadie RP. Inhibition of human complement by beta-glycyrrhetic acid. Immunology 1997; 90(1): 115-20.
- Moon A, Kim SH. Effect of Glycyrrhiza glabra roots and glycyrrhizin on the glucuronidation in rats. Planta Med 1997; 63(2): 115-9.
- Pompei R, Flore O, Marccialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. Nature

- 1979; 281(5733): 689-90.
9. Pompei R, Paghi L, Ingianni A, Uccheddu P. Glycyrrhizic acid inhibits influenza virus growth in embryonated eggs. *Microbiologica* 1983; 6(3): 247-50.
  10. Shimizu N, Tomoda M, Takada K, Gonda R. The core structure and immunological activities of glycyrrhizan UA, the main polysaccharide from the root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992; 40(8): 2125-8.
  11. Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sci* 2002; 71(12): 1449-63.
  12. Mir Heidar H. Herbal sciences. Tehran, Iran: Nashr Farhang Publication; 1994. [In Persian].
  13. Rafi MM, Vastano BC, Zhu N, Ho CT, Ghai G, Rosen RT, et al. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. *J Agric Food Chem* 2002; 50(4): 677-84.
  14. Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, et al. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2005; 230(2): 239-47.
  15. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 2006; 17(10): 689-96.
  16. Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer. *Nutr Cancer* 2001; 39(1): 1-11.
  17. Kim A, Yim NH, Yeul Ma J. Samsoum, a traditional herbal medicine, elicits apoptotic and autophagic cell death by inhibiting Akt/mTOR and activating the JNK pathway in cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013; 13: 233.
  18. Su CC, Chen GW, Tan TW, Lin JG, Chung JG. Crude extract of garlic induced caspase-3 gene expression leading to apoptosis in human colon cancer cells. *In Vivo* 2006; 20(1): 85-90.
  19. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(1): 179-84.
  20. Rossi T, Benassi L, Magnoni C, Ruberto AI, Coppi A, Baggio G. Effects of glycyrrhizin on UVB-irradiated melanoma cells. *In Vivo* 2005; 19(1): 319-22.
  21. Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Planta Med* 2005; 71(2): 130-4.
  22. Tomoda M, Shimizu N, Kanari M, Gonda R, Arai S, Okuda Y. Characterization of two polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990; 38(6): 1667-71.
  23. Hsiang CY, Lai IL, Chao DC, Ho TY. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. *Life Sci* 2002; 70(14): 1643-56.



## The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines

Soheila Khazraei-Moradian MSc<sup>1</sup>, Alireza Andalib PhD<sup>2</sup>, Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD<sup>3</sup>, Zohreh Safari<sup>4</sup>, Ahad Zare<sup>5</sup>, Gholam Ali Kardar PhD<sup>6</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Gastrointestinal cancers, especially colon are one of the most common causes of death in western countries. Due to changing dietary patterns in developing countries the rates are increasing. Already, herbal and complementary medicine has been considered as a supplement treatment. The licorice is an ancient plant in herbal medicine that has many health benefits such as anti-cancer and anti-inflammatory effects. So, the present study was designed to assess the effect of protein extract of licorice root on human colon cancer cell line (HT-29), murine colon cancer (CT26) and normal cells (HEK293) for considering the cell growth inhibition potential after treatment with the extracts.

**Methods:** Protein extracts of licorice root powder was prepared after grinding in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature. After the dialysis in PBS buffer, the protein concentration was determined by Bradford method. The cell lines HT-29, CT-26 and HEK-293 were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24 hour incubation at 37°C, the cells were treated by the concentration 25, 50 and 100µg/mL was treated of licorice extract. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay. In addition the inductions of apoptosis (Annecin-V-Fluos staining method) in the treated cells were evaluated using flow cytometric analysis.

**Findings:** Our results indicate that the up to 100µg/mL of the protein extract had not toxin effect on normal cell proliferation (HEK293). However, the viability of CT26, HT29 and HEK293 was reduced by 29.3%, 42.5% and 70% respectively by MTT assay. Moreover, the data show that CT26, HT29 and HEK293 cells were treated with 100µg/mL concentration of protein extract have been shown the apoptosis percentages of 47.72±8 (with P = 0.026), 34.93 ± 8.21 (with P = 0.056) and 17.5 ± 6.5 (with P = 0.07) respectively in comparison with not treated cells.

**Conclusion:** It appears that protein extract of licorice root could inhibit the colon cancer cell line proliferation and can be used as an adjuvant treatment.

**Keywords:** Licorice, Apoptosis, Colon cancer

**Citation:** Khazraei-Moradian S, Andalib A, Ganjalikhani-Hakemi M, Safari Z, Zare A, Kardar GhA. **The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): ??.

1- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan AND Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Cellular and molecular immunology research center-Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan

3- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan

4- Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- PhD student, Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Assistant Professor, Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Gholam-Ali Kardar PhD, Email: gakardar@tums.ac.ir