

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

اکبر صفی پور 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 شیرین بیان 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 شیرین بیان بر بیان ژن ODC1 در سلول‌های سرطانی پستان انسان و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی است.

واژگان کلیدی: ODC1، ضد سرطان، شیرین بیان، سایتوتوکسیک

مقدمه

سرطان یکی از شایع ترین 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 سرطان های زنان را شامل می شود و احتمال ابتلای یک خانم در طول ۹۰ سال زندگی ۱ به ۸ است (۳). بنابراین تحقیقات گسترده ای جهت شناسایی ژن های دخیل در سرطان پستان انجام شده است که یکی از مهم ترین آن ها ژن Ornithine Decarboxylase (ODC) است. محصول آنزیمی این ژن در کاتالیز اورنیتین به پوترسین نقش دارد که از واکنش های دخیل در سنتز پلی آمین ها است (۴). پلی آمین ها برای پایدار نگه داشتن ساختار DNA و ترمیم شکستگی ها در آن ضروری می باشند (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 می شود. از طرف دیگر افزایش بیان ODC نیز باعث افزایش میزان سرطان زایی می شود چون ODC هدف آنکوژن myc است به طوری که در انواع سرطان میزان بیان آن افزایش می یابد (۶). آزمایش های گوناگونی نشان داده است که میزان بیان این ژن در سلول های سرطانی نسبت به سلول های عادی پستانی افزایش چشمگیری داشته است (۷-۹). از این رو استفاده از روشی که منجر به کاهش بیان ژن ODC و فعالیت آنزیمی آن بشود می تواند راه حل موثری در درمان سرطان پستان باشد.

استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان داروی ضد سرطان به دلیل عدم وجود عوارض جانبی، در پیشگیری و درمان این بیماری موثر است (۱۰، ۱۱). گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* دارای ریشه ای 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 آنزیم ها را بر عهده دارند (۱۲). وجود ترکیبات کاهش دهنده چربی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی اکسیدانت قوی در این گیاه گزارش شده است (۱۰). همچنین اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه شیرین بیان بررسی شده 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 شیرین بیان بر دو رده سلولی سرطانی (MCF-7, MDA-MB-231) و رده نرمال (MCF-10A) سلول های پستانی انسان، سطح بیان ژن ODC نیز ارزیابی می شود.

مواد و روش ها

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

تهیه عصاره گیاهی: جهت تهیه عصاره آبی از ریشه گیاه شیرین بیان استفاده شد که از شهر نیشابور واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شد. گونه گیاهی شیرین بیان توسط آقای طاهری شناسایی و کد هرباریومی (۱۰۳۵) در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور به آن اطلاق شد. بدین منظور ۵۰ گرم از ریشه درون پارچه نظیف و در محفظه دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت به طوری که رنگ عصاره به قهوه ای تیره تغییر یافت. سپس حذف آب عصاره ها به وسیله دستگاه روتاری تا حد ممکن انجام شد. عصاره های غلیظ در درون ظروف درباز در محیط آزمایشگاه جهت تبخیر آب باقی مانده قرار داده شدند. در پایان عصاره های خشک جمع آوری و جهت تهیه غلظت های مورد نظر به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

در این پژوهش از غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ها استفاده شد. جهت تهیه این غلظت‌ها ابتدا یک استوک ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره خشک تهیه و برای ساخت سایر غلظت‌ها استفاده شد. برای غلظت صفر از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

رده‌های سلولی و محیط کشت: در این تحقیق از رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 و رده سلولی نرمال MCF-10A استفاده شد. سلول‌های MCF-7 از آزمایشگاه کشت سلول دانشکده علوم دانشگاه فردوسی تهیه شد و دو رده دیگر از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران) خریداری شدند. سلول‌ها در فلاکس ۲۵ سانتی‌متر مربع به همراه ۱۰ درصد FBS (سرم جنینی گاوی)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شدند. محیط کشت روزانه تعویض شده و هر ۳ تا ۴ روز پاساژ داده شدند.

سنجش سمیت سلولی: فعالیت سایتوتوکسیسیته عصاره با استفاده از سنجش MTT (bromide) (2,3,5-diphenyl tetrazolium) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش MTT به نمونه‌ها اضافه شده و توسط یک آنزیم میتوکندریایی شکسته می‌شود و تولید فورمازون نامحلول کرده که قابل اندازه‌گیری است و به این شیوه می‌توان تعداد سلول زنده در نمونه را تعیین کرد. بدین منظور نمونه‌هایی با تراکم ۳۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها اضافه و به مدت ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مدت مقدار ۲ میلی‌مولار محلول MTT به هر خانه اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر DMSO (dimethyl sulfoxide) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد.

نهایتاً جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه (Awareness, Palm City, FL, USA) ELISA microplate reader اندازه‌گیری شد. این تست برای هر غلظت سه بار تکرار شد. همچنین جهت تایید صحت سنجش MTT رنگ آمیزی با تریپان بلو انجام شد. به منظور تعیین درصد سلول‌های زنده در هر غلظت عصاره، میانگین جذب‌های نوری سلول‌های تیمار شده با غلظت مورد نظر از عصاره بر میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO تقسیم و در نهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. غلظت موثر عصاره دارای سمیت سلولی، با کمیتی به نام IC₅₀ گزارش شد که نشان‌دهنده غلظتی است که در آن نیمی از سلول‌ها زنده می‌باشند به منظور محاسبه IC₅₀ عصاره‌ها از نرم‌افزار Prism 5.0 استفاده شد.

اندازه‌گیری بیان نسبی ODC1. بررسی کمی بیان ژن ODC1 با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام شد. بدین منظور ابتدا هر سه رده سلولی کشت داده شد و در مرحله بعد غلظت‌های مختلف عصاره به آن‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه و سپس جهت استخراج RNA استفاده شدند. همه تیمارها در سه تکرار انجام شد.

جهت طراحی آغازگرهای ویژه ژن اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC1) از توالی مربوط به mRNA این ژن که در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی NM_002539.2 موجود است، استفاده شد. طراحی آغازگر با در نظر گرفتن نکات استاندارد در طراحی آغازگر از جمله طول آغازگر، دمای اتصال، G+C%، ایجاد دایمر، تولید لوپ یا حلقه در درون هر یک از آغازگرها و ΔG مناسب با استفاده از نرم‌افزار Oligo (Naltional Biosciences Inc., Ver. 7.5) سنتز آغازگرهای طراحی شده به واسطه شرکت ندای فن راه در شانگهای چین انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای طراحی شده برای ژن های ODC1 و ACTB

نام آغازگر	توالی 5' - 3'	طول باز پایه	طول م ژن (bp)	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	

PCR استخراج و پس از محاسبه پارامترهای مربوطه آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

بررسی سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیرین بیان

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه شیرین بیان بر درصد زنده ماندن سلول‌ها نشان داد که با افزایش غلظت و زمان، تاثیر عصاره بر سلول‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر شده و افزایش قابل توجهی در مرگ و میر سلول‌ها دیده می‌شود. به‌طوری‌که از غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بعد اثرات سمیت سلولی عصاره محسوس تر 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 تاثیر بیشتری قرار گرفته 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

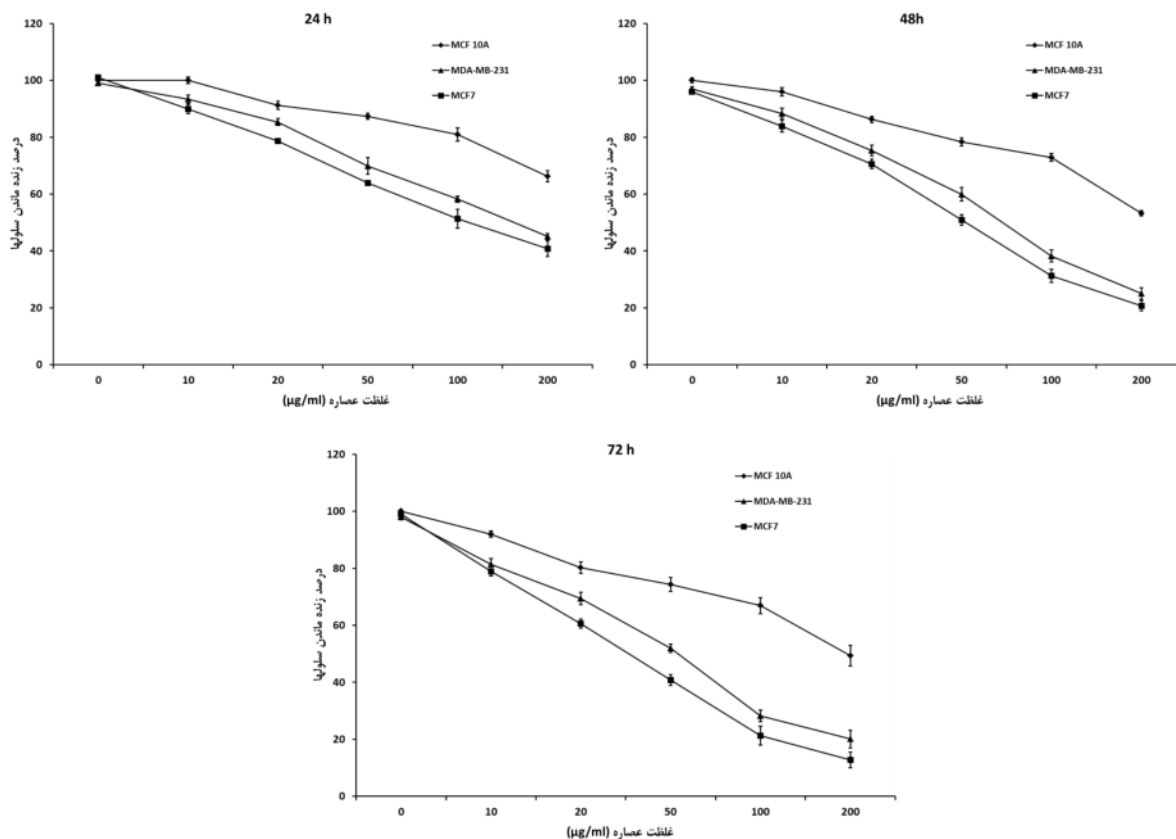
در این پژوهش Real-time PCR با استفاده از روش SYBR Green و با به‌کارگیری دستگاه ABL step-one (Applied Biosystems) انجام شد. ساختار شده از RNA استخراج شده از نمونه‌ها به‌عنوان الگو برای واکنش‌های qRT-PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌ها در نظر گرفته شد و ژن بتا اکتین هم به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. اجزای مختلف ۲۰ میکرو لیتر مخلوط واکنش qRT-PCR شامل ۱۰ میکرو لیتر SYBER Green PCR Master Mix (ABI)، ۰/۴ میکرو لیتر Forward primer، ۰/۴ میکرو لیتر Reverse primer، ۶/۲ میکرو لیتر H₂O و ۳ میکرو لیتر 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 نهایتاً 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 $\Delta\Delta Ct$ 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

که مقادیر آن در جدول ۲ آورده شده است.

بیش از ۵۰ درصد میزان بقای سلول‌ها (IC_{50}) می‌شود



شکل ۱: منحنی تغییرات اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شیرین‌بیان بر درصد زنده‌مانی سه رده سلولی پستان. داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت به همراه انحراف معیار می‌باشد.

جدول ۲: 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

بررسی شد. نتایج این واکنش به صورت نمودارهای منحنی ذوب و تکثیر ژن‌ها که توسط دستگاه ترسیم شد (شکل‌های ۲ و ۳). در نمودارهای منحنی ذوب وجود یک پیک و عدم حضور پیک‌های اضافی نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر و راندمان مناسب واکنش PCR می‌باشد. نمودارهای تکثیر قطعات نیز حاکی از

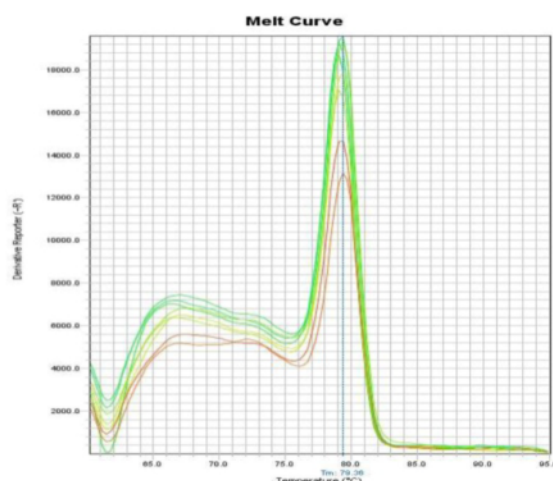
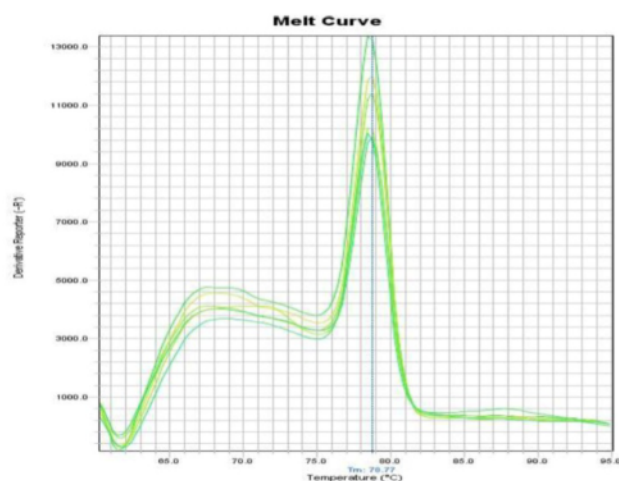
اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر میزان نسبی بیان ژن

ODC1

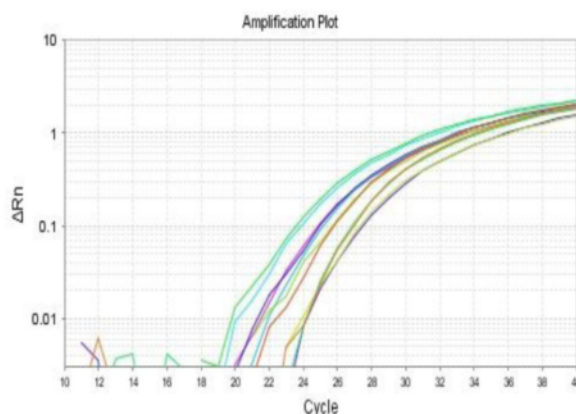
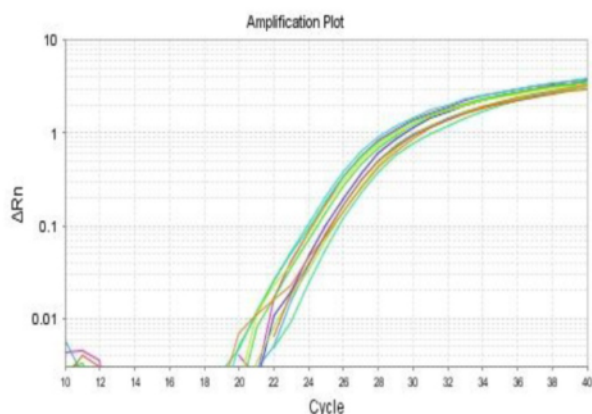
واکنش qRT-PCR به روش Real-time SYBER Green PCR توسط دستگاه ABI Step-One (Applied Biosystem) انجام شد. در این روش همه داده‌های مربوط به ژن ODC1 با ژن ACTB به عنوان کنترل داخلی نرمالایز شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در غلظت‌های مختلف عصاره و رده‌های مختلف سلولی

افزایش موازی فلورسانس تمام نمونه‌ها طی مرحله

لگاریتمی رسیدن به ثبات نسبی تا چرخه ۴۰ است.



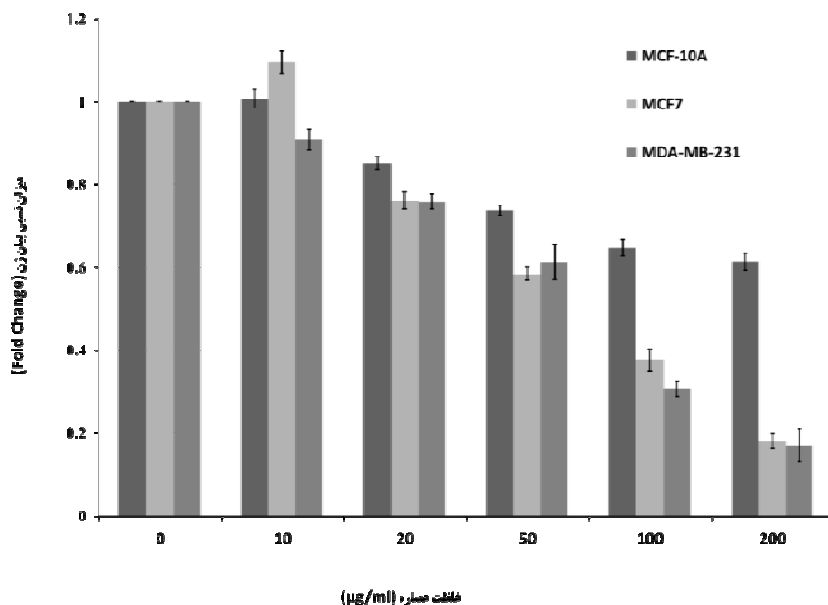
شکل ۲: منحنی ذوب محصولات Real-Time PCR برای ژن‌های ODC1 (سمت راست) و ACTB (سمت چپ). نقطه ذوب تمامی نمونه‌ها برای ژن‌های ACTB و ODC1 حدود ۷۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر است.



شکل ۳: منحنی فلورسانس نمونه‌های cDNA ژن‌های ODC1 (سمت راست) و ACTB (سمت چپ). از هر نمونه ۳ تکرار گذاشته شد تا میانگین نتیجه آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. فلورسانس تمام نمونه‌ها به‌طور موازی طی مرحله لگاریتمی افزایش می‌یابد و تا چرخه ۴۰ به ثبات نسبی می‌رسند.

غلظت‌های مختلف می‌توان چنین اظهار داشت که در هر غلظت عصاره کمترین بیان مربوط به رده سلولی MDA-MB-231 است، اگرچه در غلظت‌های ۲۰، ۵۰ و ۲۰۰ تفاوت معنی‌داری بین این رده و رده MCF-7 مشاهده نمی‌شود (شکل ۴). بنابراین به‌طور کلی می‌توان گفت که بیان ژن ODC1 در رده MDA-MB-231 بیشتر تحت تأثیر عصاره گیاه شیرین بیان قرار گرفته است.

مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن ODC1 در سه رده سلولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه شیرین بیان نشانگر کاهش بیان ژن با افزایش غلظت عصاره‌ها نسبت به شاهد است. به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره میزان نسبی بیان این ژن در سه رده نرمال، MDA-MB-231 و MCF-7 به ترتیب ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۳ برابر کاهش یافته است. همچنین در مقایسه بیان این ژن در سه رده سلولی تحت تاثیر



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

بحث

گیاه شیرین بیان یک گیاه دارویی با ترکیبات شیمیایی و موثره مفید و متنوعی است و به همین دلیل در صنایع غذایی و دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. از این گیاه یک گلیکوزید تری ترپن بنام گلیسریرین به دست 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 انجام شده است. به طور مثال در مطالعه Khazraei و همکاران (۱۴) نشان داده شده است که عصاره گیاه شیرین بیان بر رده‌های سلولی سرطان‌های معده‌ای روده‌ای تاثیر معنی‌داری داشته و از طریق القای آپوپتوزیس، موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی شده در حالی که بر سلول‌های نرمال هیچ‌گونه تاثیر معنی‌دار و منفی ندارد. همچنین در مطالعه Fu و همکاران (۱۰) فلاونوئید استروژنی Licochalcone استخراج شده از ریشه گیاه شیرین بیان 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. به علاوه در پژوهشی دیگر اثر فلاونوئید Glabridin بر سلول‌های رده-MDA-231 و 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 شیرین بیان 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 شیرین بیان بر رده‌های سلولی مورد مطالعه دارای اثر سمیت سلولی به‌روش وابسته به دوز و زمان است. به طوری که باگذشت زمان IC_{50} عصاره شیرین بیان در هر سه رده سلولی کاهش نشان داد (جدول ۱). البته باید

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

اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) از آنزیم های مهم در سنتز پلی آمین ها است و تجمع پلی آمین ها در انواع متعددی از سلول های سرطانی دیده شده است (۳). در نتیجه میزان فعالیت آنزیم ODC می تواند به عنوان 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 راه کاری مناسب برای جلوگیری از رشد و تکثیر سلول های سرطانی است (۹، ۱۷). در دهه اخیر استفاده از ترکیبات با منشا گیاهی یا عصاره های گیاهی در تحقیقات ضد سرطان و به ویژه در راستای کاهش پلی آمین ها و اورنیتین دکربوکسیلاز رو به فزونی گذاشته است که می توان به تیمار خوراکی موش های مبتلا به سرطان پوست با ماده گلیسرین استخراج شده از ریشه گیاه شیرین بیان 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 بافت های سرطانی و غیر سرطانی ریه انسان مقایسه شد و مشخص شد میزان mRNA این ژن در بافت های سرطانی به طور قابل توجهی بیشتر از بافت های 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 شیرین بیان اثر ضد سرطانی بر سلول های سرطانی

پوست دارند. این ترکیبات از طریق تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و تخریب غشای داخلی میتوکندری سبب القای آپوپتوزیس می شوند. همین طور با فعال سازی آنزیم های مانند کوئینون اکسیدو ردوکتاز سبب تخریب پروتئین ODC می شوند.

نتایج این تحقیق حاکی از کاهش معنی دار 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 شیرین بیان اطلاعی در دست نیست اما به دلیل وجود عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتوری این ژن، تنظیم در سطح رونویسی از طریق این عناصر می تواند یکی از عوامل باشد. مهار بیان ژن ODC1 و متعاقباً کاهش میزان آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز منجر به پایین آمدن سطح پلی آمین ها در سلول های سرطانی می شود. کمبود پلی آمین ها به عنوان جاروب کننده رادیکال های آزاد سبب تجمع این رادیکال ها و وقوع آپوپتوزیس می شود. در مقایسه بین دو رده سرطانی میزان کاهش بیان ژن ODC1 در رده MDA-MB-231 نسبت به رده MCF7 به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشتر بود در حالی که سمیت عصاره در رده MCF7 بیشتر بود. پاسخ متفاوت این دو رده سلولی، می تواند به تفاوت های ژنتیکی این دو رده مربوط باشد به طوری که رده MCF7 واجد گیرنده استروژن و پروژسترون و فاقد گیرنده HER2 است (ER+/PR+/HER2-)، در حالی که رده MDA-MB-231 فاقد هر سه گیرنده استروژن، پروژسترون و HER2 است (۲۱).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بیانگر سمیت انتخابی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان بر سلول های 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 عصاره های گیاهی ذکر شده است اما با توجه به نتایج

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, Isaguliant MG, Hyvonen MT, Keinänen TA, et al. Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine

تحقیق حاضر می‌توان احتمال داد که عصاره گیاه شیرین بیان 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 حاضر توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور تامین شده است، که به این وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

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

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.

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 ODC1 gene 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-231 cell 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.