مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره یازدهم، بهمن ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۲

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره های آبی و الکلی ریشه گیاه شیرین بیان و مقایسه تاثیر آپوپتوزی آن‌ها بر روی رده سلولی سرطان کبد

نیما رضائیان قراگزلو[۱]، فهیمه باغبانی آرانی*[۲]، سید عطا اله سادات شاندیز[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: کارسینومای هپاتوسلولار HCC Hepatocellular carcinoma به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بدخیمی اولیه کبد و سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان به شمار می‌رود. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای ترکیبات شیمیایی و آپوپتوز سلولی دو نوع عصاره الکلی و آبی ریشه گیاه شیرین بیان بر روی رده سلولی سرطانی کبد HepG2 انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ترکیبات شیمیایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه شیرین بیان با استفاده از روش GC/MS مورد ارزیابی قرار گرفته شد. رده سلولی سرطان کبد $HepG_2$ در محیط کشت $RPMI_{1640}$ حاوی ۱۰ ٪ سرم جنین گاوی تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسیدکربن ۵ درصد رشد داده شدند. فعالیت سمی عصاره‌های آبی و الکلی با کمک آزمون رنگ آمیزی MTT طی زمان ۲۴ ساعت محاسبه شد. به‌منظور ارزیابی القای آپوپتوز در سلول‌های HepG2 از رنگ‌آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ استفاده شد.

نتایج: آنالیز داده‌های فیتوشیمیایی عصاره آبی، تعداد ۱۸ ترکیب را نشان داد که عمده‌ترین میزان آن مربوط به Dodecane (۱۳/۳۴٪) و2',6'-Dihydroxyacetophenone bis(trimethylsilyl) ether (۱۲/۴۸٪) بود. آنالیز داده‌های فیتوشیمیایی عصاره الکلی، ۱۷ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده آن Pentadecane (۷/۷۸٪) و 2,6,11,15-Tetramethylhexadecane (۴/۶۷٪) بود. نتایج تست MTT نشان داد که سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ها سمیت سلولی وابسته به دوز دارند. نتایج رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۵۸ نشان داد عصاره الکلی نسبت به آبی می‌تواند باعث قطعه قطعه شدن بیشتر DNA هسته‌ای رده سلولی سرطانی HepG2 شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان گفت که عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین‌بیان نسبت به عصاره آبی اثر القای آپوپتوز بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی HepG2 دارد و با تحقیقات بیشتری می‌توان از آن در درمان سرطان کولون بهره برد.

واژه‌های کلیدی: گیاه شیرین بیان، سرطان کبد، آپوپتوزی، $HepG_2$

ارجاع: رضائیان قراگزلو نیما، باغبانی آرانی فهیمه، سادات شاندیز سید عطا اله. **شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره های آبی و الکلی ریشه گیاه شیرین بیان و مقایسه تاثیر آپوپتوزی آن‌ها بر روی رده سلولی سرطان کبد.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱۱): ۸۸-۹۷۸

۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۳۶۷۲۵۰۱۱-۰۲۱، پست الکترونیکی: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir، کد پستی :۳۳۸۱۷-۷۴۸۹۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

مقدمه

کارسینومای هپاتوسلولار (HCC) شایع‌ترین بدخیمی اولیه کبد در جهان بوده و سومین علت شایع مرگ در اثر سرطان است. گزارشات حاکی از آن است که میزان ابتلا به بیماری در بعضی کشورها مانند کشورهای اروپای مرکزی، آمریکای شمالی و اقیانوسیه به علل نامعلومی در حال افزایش است. این در حالی است که مرگ و میر در اثر سایر عوارض مرتبط با سیروز کبدی رو به کاهش گذاشته است. میزان بقای پنج ساله HCC در سراسر جهان کمتر از ۵٪ است و هر سال در حدود ۶۰۰,۰۰۰ بیمار مبتلا جان خود را از دست می‌دهند (۱).

امروزه، ضرورت دستیابی به ترکیبات موثر طبیعی با اثرات جانبی کم و مقرون به صرفه برای پیشگیری و درمان بیماری سرطان، بیشتر احساس می‌گردد (۲). در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات گیاهی برای جلوگیری و مداخله در مراحل مختلف سرطان‌زایی توجه بیشتری شده است. در میان ترکیبات مهار کننده سرطان، آنتی اکسیدانت های پلی فنولی طبیعی به دلیل کارایی بالا و اثرات سیستمیک کمتر، یکی از موثرترین ترکیبات مهار کننده سرطان می‌باشند (۳). گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L*) مدت‌های زیادی است که به‌عنوان یکی از گیاهان پر کاربرد در طب سنتی برای درمان التهاب، بثورات پوستی، نفخ و آلرژی استفاده می‌شود. ریشه گیاه شیرین‌بیان شامل ترپن‌ها (اسید glycyrrhizic)، فلاونوئیدها، کومارین ها، پلی ساکاریدها، پلی آمین، استرول، فیتواستروژن و ویتامین ها است (۴).

گیاه شیرین‌بیان به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانتی بالا، به‌عنوان یکی از گیاهان پرکاربرد در طب سنتی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته شده است. این گیاه از تیره Leguminosae بوده و در طب سنتی آسیا و اروپا در معالجه عفونت‌های تنفسی، روماتیسم و گاستریت به‌کار گرفته شده است (۵،۶). گلیسریزا گلابرا یک نام یونانی بوده و از دو واژه گلیکیس به معنی شیرین و ریزا به معنی ریشه مشتق شده است. ارتفاع شیرین بیان متفاوت و بین 200-100 سانتی‌متر بوده و دارای شاخ و برگ‌های انبوه و فراوان است. برگ‌ها، مرکب و دارای چهار تا هفت جفت برگچه و یک برگچه انتهایی است. گل‌های این گیاه نامنظم و به رنگ زرد، ارغوانی یا بنفش و به صورت مجتمع در انتهای ساقه‌های گل دهنده مشاهده می‌شوند. این گیاه اواخر بهار و اوایل تابستان (خرداد و تیر) گل می‌دهد. ریزوم و ریشه، قسمت های مورد استفاده گیاه بوده که مواد موثر آن جز دسته ساپونین گلیکوزید هاست. ریشه خشک شیرین بیان دارای ۱ تا ۵ درصد از ترکیبات پلی‌فنلی به همراه ترکیبات فنلی اصلی liquiritin و liquiritigenin می‌باشد. عصاره فعال از پیش ترکیبی به نام اسید گلیسیرزیک (glycyrrhizic) تشکیل شده است که تحت هیدرولیز توسط باکتری‌های روده به یک ترکیب دارویی فعال به نام اسید glycyrrhetinic تبدیل می‌شود (۷). هم‌چنین، این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان درمان ضد سرفه و ورم معده بکار گرفته شده است (۸،۹).

پژوهش‌ها نشان داد که گیاه شیرین بیان به دلیل دارا بودن برخی از ترکیبات فعال، اثرات ضد باکتریایی و ضد سرطانی داشته است (۱۰). با توجه به عدم تشخیص به موقع سرطان کبد و کاستی‌هایی که در درمان آن وجود دارد، منجر به محدود شدن روش‌های درمانی آن شده است. لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی مقایسه‌ای اثرات آپوپتوزی و ضد تکثیری عصاره‌های آبی و الکلی ریشه ی گیاه شیرین بیان‌بر روی رده سلولی سرطانی کبد HepG2 می‌باشد.

روش بررسی

تهیه عصاره های الکلی و آبی

در این مطالعه تجربی، ابتدا گیاه شیرین‌بیان از مزارع شهرستان اصفهان جمع آوری گردید. ریشه گیاه شسته شده و در مجاورت هوا و آفتاب به مدت ۴۸ قرار گرفته شد تا کاملاً خشک شوند. سپس توسط دستگاه آسیاب برقی کاملا پودر شد. برای تهیه عصاره آبی مقدار ۱۰ گرم پودر ریشه گیاه شیرین بیان به حدود ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر درون بشرافزوده شد و پس از گذشت حدود ۱۵ دقیقه، مایع حاصله توسط قیف بوخنر با استفاده از کاغذ صافی معمولی صاف شده و به دستگاه حذف حلال منتقل شد. به منظور تهیه عصاره الکلی، حدود ۱۰۰ گرم

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

از ریشه گیاه انتخاب گردید و پس از استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر در آمدند. سپس پودر حاصل با یک لیتر اتانول ۷۰ درصد در پرکولاتور مخلوط شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس عصاره حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ و به کمک دستگاه فریز درایر خشک گردید و به صورت پودر در آمد. عصاره‌های خشک به‌دست آمده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند. به‌منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره‌های آبی و الکلی از دستگاه GC/MS استفاده شد (۱۱).

شناسایی ترکیبات گیاهی با استفاده از دستگاه GC/MS

عصاره‌های شیرین بیان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 6890 (Agilent Technologies Inc., Clara, CA, USA) با طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر انجام گرفت. برنامه حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۶ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تنظیم شد. گاز حامل هلیوم با سرعت جریان گاز ۱۵ میلی‌لیتر در دقیقه و مقدار تزریق ۱ میکرولیتر تنظیم شده بود. عصاره گیاه پس از آماده سازی، با حجم ۱ میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق گردید و سپس شناسایی طیف‌ها براساس اندیس کواتس و رجوع به فرهنگ طبیعی مشخص شد. تفسیر طیف‌های به‌دست آمده با کمک اطلاعات موجود در National Institute Standard and Technology (NIST)، صورت گرفت (۱۲).

کشت سلولی

ده سلولی سرطان کبد $HepG_2$ از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری شد و درون فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی با محیط کشت کامل $RPMI_{1640}$ (Biosera, USA) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco, Scotland)، پنی سیلین (۱۰۰ یونیت در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تحت شرایط کشت داده شدند و تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند (۱۳،۱۴).

تست رنگ سنجی MTT

به منظور بررسی اثر عصاره‌های ریشه گیاه شیرین بیان برروی رشد و تکثیر با استفاده از روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) انجام گرفت. پس از تیمار غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گیاه شیرین بیان بر روی رده سلولی سرطانی HepG2 تیمار شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان واکنش، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Sigma Aldrich، آلمان) اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ ٪ نگه داشته شدند. سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان بقای سلولی توسط فرمول زیر محاسبه شد:

(جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری ×۱۰۰

سلول‌های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

هم‌چنین میزان دوز ۵۰ ٪کشندگی (IC_{50}) یا غلظتی از دارو که ۵۰ درصد رشد سلول را نسبت به کنترل کاهش می‌دهد مطابق مطالعه قبلی محاسبه شد (۱۵).

رنگ آمیزی هوخست جهت بررسی تغییرات مورفولوژی

در ابتدا سوسپانسیون سلولی معادل بیست هزار سلول در پلیت ۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت‌های IC_{50} عصاره‌های آبی و الکلی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. لایه سلول‌ها تخلیه شد و محیط کشت با PBS شستشو داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند و پس از شستشوی مجدد با PBS، لایه سلولی با رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ پوشانده شد. پس از ۱۵ دقیقه تیمار رنگ، ریخت‌شناسی هسته سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Incell Analyser 2000, GE

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

Healthcare Life Sciences، USA) عکس‌برداری و مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج این تحقیق با واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده های این تحقیق با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. هم‌چنین، مقدار P<0/05 در هر تست مرز معنی‌دار تلقی شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق در سال ۱۳۹۴ توسط دانشگاه آزاد واحد ورامین پیشوا مورد تایید قرار گرفته و دارای کد پژوهشی ۱۴ ۳۳۰۵۰۳۹۴۲۰۲۸می‌باشد.

نتایج

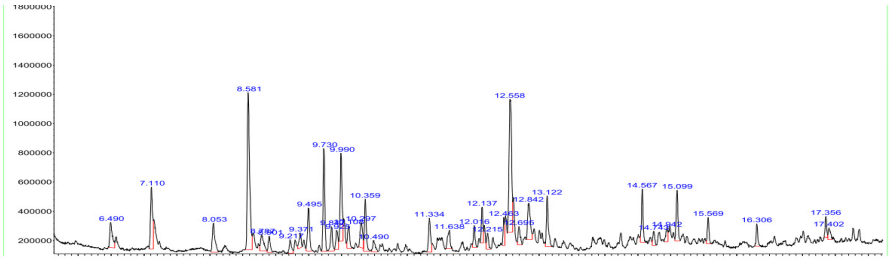
تجزیه و تحلیل ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه با استفاده از آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره آبی (شکل ۱) مشخص شد. پس از مقایسه طیف های عصاره آبی گیاه با اطلاعات کتابخانه NIST، ۱۸ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان ترکیبات شناسایی شده Dodecane (۱۳/۳۴ ٪) و 2',6'-Dihydroxyacetophenone bis(trimethylsilyl) ether (۱۲/۴۸٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل‌دهنده بودند (جدول ۱). هم‌چنین تجزیه و تحلیل ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه با استفاده از آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره الکلی نیز انجام گرفت که در شکل ۲ مشخص شده است. شرایط یکسان برای مقایسه طیف‌های عصاره الکلی، ۱۷ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده آن Pentadecane (۷/۷۸ ٪) و 2,6,11,15-Tetramethylhexadecane (۴/۰۲ ٪) بود (جدول ۲).

نتایج سمیت عصاره ها

نتایج سنجش توان زیستی سلول‌های HepG2 بر اساس روش MTT با غلظت‌های مختلف از عصاره‌های آبی و الکلی طی مدت ۲۴ ساعت در پژوهش قبلی نشان داده شده بود (۱۵). به‌طوری که با افزایش میزان غلظت عصاره‌ها تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، توانایی زنده بودن سلول‌ها کاهش معنی‌داری نشان نداد. در حالی که در غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توان زنده بودن سلول‌ها به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. میزان غلظتی از عصاره‌ها که بتوانند زیستایی سلول‌های سرطانی HepG2 را تا ۵۰ درصد کاهش دهد (IC_{50}) در مدت زمان ۲۴ ساعت محاسبه شد. میزان محاسبه شده IC_{50} برای رده سلولی HepG2 تیمار شده با عصاره الکلی و آبی عصاره شیرین‌بیان در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب µg ۴۷۶/۲۸/ml و ۵۶۷/۹۲µg/ml محاسبه شد که تفاوت پاسخ دو نوع عصاره را در رده سلولی سرطانی، نشان می‌دهد.

نتایج آپوپتوز در رده سلولی

تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها بعد از تیمار با غلظت IC_{50} عصاره‌های آبی و الکلی شیرین بیان در مدت زمان ۲۴ ساعت با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست شامل تغییر شکل و متراکم شدن هسته در مقایسه با گروه کنترل بود (شکل ۳). با توجه به شکل ۳، قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های تیمار شده با عصاره الکلی شیرین بیان بیشتر از عصاره آبی مشاهده می‌شود.



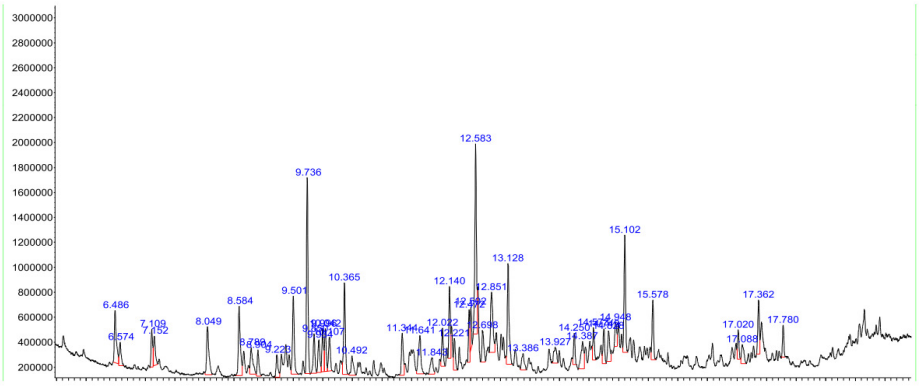
شکل:۱ کروماتوگرام به‌دست آمده از عصاره آبی ریشه گیاه شیرین بیان تحت آنالیز GC-MS. آنالیز کروماتوگرام ۱۸ پیک را نشان داد که نشان دهنده ۱۸ ترکیب مختلف در عصاره گیاهی می باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

جدول ۱: آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره آبی ریشه گیاه شیرین بیان

No.	Compound identified	Molecular formula	MW	RT (min)	Peak area (%)	Structure
1	Tetradecane	$C_{14}H_{30}$	198	6.490	2.346	
2	Undecane	$C_{11}H_{24}$	156	7.110	4.776	
3	Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	$C_9H_{20}O_2Si$	188	8.053	2.680	
4	Dodecane	$C_{12}H_{26}$	170	8.581	13.346	
5	2,6-Dimethylundecane	$C_{13}H_{28}$	184	8.787	1.806	
6	4,8-Dimethylundecane	$C_{13}H_{28}$	184	8.901	1.183	
7	5,8-Diethyldodecane	$C_{16}H_{34}$	226	9.217	1.090	
8	Hexadecane	$C_{16}H_{34}$	226	9.495	3.251	
9	2,6,11-Trimethyldodecane	$C_{15}H_{32}$	212	9.730	6.412	
10	2,6,10-Trimethyltetradecane	$C_{17}H_{36}$	240	9.847	1.761	
11	n-Tridecane	$C_{13}H_{28}$	184	9.990	5.800	
12	1-Monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether	$C_{27}H_{54}O_4Si_2$	498	10.297	2.268	
13	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)	$C_{26}H_{54}$	366	12.215	1.084	
14	2',6'-Dihydroxyacetophenone, bis(trimethylsilyl) ether	$C_{14}H_{24}O_3Si_2$	296	12.558	12.488	
15	n-Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	380	12.695	1.388	
16	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	$C_{14}H_{22}O$	206	12.842	3.540	
17	2,6,10,15-Tetramethylheptadecane	$C_{21}H_{44}$	296	13.122	3.575	
18	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	$C_{17}H_{24}O_3$	276	17.402	0.939	

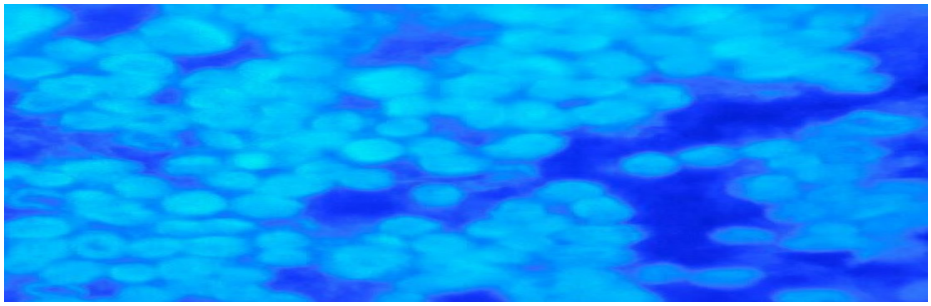


شکل۲: کروماتوگرام به‌دست آمده از عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین بیان تحت آنالیز GC-MS. آنالیز کروماتوگرام ۱۷ پیک را نشان داد که نشان دهنده ۱۷ ترکیب مختلف در عصاره گیاهی می‌باشد.

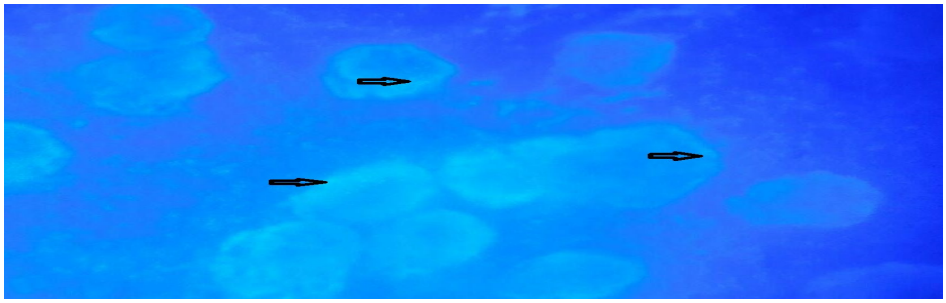
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]
[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

جدول ۲: آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین بیان

No.	Compound identified	Molecular formula	MW	RT (min)	Peak area (%)	Structure
1	n-Dodecane	$C_{12}H_{26}$	170	6.486	2.795	
2	2-Methylundecane	$C_{12}H_{26}$	170	6.575	1.096	
3	n-Undecane	$C_{11}H_{24}$	156	7.110	1.504	
4	Silane, cyclohexyldimethoxymethyl	$C_9H_{20}O_2Si$	188	8.049	2.922	
5	2,6-Dimethylundecane	$C_{13}H_{28}$	184	8.789	1.718	
6	4,8-Dimethylundecane	$C_{13}H_{28}$	184	8.904	1.216	
7	n-Tetradecane	$C_{14}H_{30}$	198	9.223	1.173	
8	Pentadecane	$C_{15}H_{32}$	212	9.736	7.784	
9	n-Hexadecane	$C_{16}H_{34}$	226	9.934	1.616	
10	n-Tridecane	$C_{13}H_{28}$	184	9.996	1.935	
11	2,6,10-Trimethyltetradecane	$C_{17}H_{36}$	240	10.107	1.631	
12	2,6,11-Trimethyldodecane	$C_{15}H_{32}$	212	10.365	4.042	
13	2,6,10,15-Tetramethylheptadecane	$C_{21}H_{44}$	296	12.698	1.596	
14	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	$C_{14}H_{22}O$	206	12.851	3.758	
15	2,6,11,15-Tetramethylhexadecane	$C_{20}H_{42}$	282	13.128	4.671	
16	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-1-[[(trimethylsilyl)oxy]methyl]ethyl ester	$C_{27}H_{52}O_4Si_2$	496	14.573	1.218	
17	n-Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	380	14.749	1.513	



(الف)



(ب)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]



(ج)

شکل ۳: نتایج رنگ آمیزی هوخست.(الف) گروه کنترل که شامل سلول‌های تیمار نشده (ب) سلول‌های تیمار شده با عصاره الکلی ریشه شیرین بیان. فلش‌ها نشان‌دهنده هسته های قطعه قطعه شده‌اند (ج) سلول‌های تیمار شده با عصاره آبی ریشه شیرین بیان می‌باشد.

بحث

بهره‌گیری از خواص ضد سرطانی عصاره‌های گیاهی از چندین سال قبل مشخص شده بود و رجوع دوباره جهت بکارگیری از گیاهان دارویی می‌تواند راهبرد موثری در مهار و پیش‌روی طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان باشد (۱۶،۱۷). بکارگیری ترکیبات ترپونوئیدی و فلاونوئیدی به همراه ترکیبات دیگر اثرات مهاری موثری در پیشروی سرطان‌ها دارند و می‌تواند اثرات سینرژیستی در شیمی‌درمانی داشته‌باشد. تا به امروز مطالعات بسیاری نشان داد که عصاره شیرین بیان بر روی سرطان‌های مختلف تاثیر مهاری دارد (۲۰-۱۸). در تحقیق حاضر، مقایسه اثرات سمیت و آپوپتوزی دو نوع عصاره اتانولی و آبی ریشه شیرین‌بیان گونه بومی ایران به انجام رسید که پژوهش Basar و همکاران در سال ۲۰۱۵ را تایید می‌نماید. در تحقیق این پژوهشگران نشان دادند که اثر سمیت سلولی عصاره الکلی ریشه گیاه شیرین بیان جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف برروی رده‌های سرطانی ریه (A549) و کبد (HepG2) چشم‌گیر می‌باشد (۱۹). در این تحقیق ارزیابی درصد توانایی حیاتی سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون رنگ آمیزی MTT نشان داده شد که عصاره ها موجب کاهش چشم‌گیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند و مرگ ومیر این سلول با افزایش زمان و غلظت، افزایش می‌یابد. میزان دوز ۵۰٪ کشندگی به‌دست آمده برای عصاره الکلی شیرین بیان کمتر از عصاره آبی علیه رده سلولی سرطانی HepG2 محاسبه شد که نشان دهنده بالا بودن قدرت کشندگی این نوع از عصاره است. هم‌چنین، عصاره الکلی ریشه شیرین بیان در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را در مقایسه با عصاره آبی از خود نشان داد که از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. در مطالعه‌ای که توسط Chien و همکاران انجام گرفت جداسازی ترکیبات Glycyrrhizin توسط کروماتوگرافی و تجزیه و تحلیل زیست شناختی دارویی انجام گرفت و نشان دادند که این ترکیبات دارای خواص ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد ویروسی و محافظت سلول‌های کبدی از سیروز می‌باشند (۲۱). در پژوهشی که درباره فعالیت ضد سرطانی عصاره شیرین بیان انجام شده، تاثیرات مثبت آن بر روی تومورهای پستان با کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی *bcl-2* را تایید می‌کند. تحقیقات نشان داده عصاره شیرین بیان منجر به مهار بیان سیکلین B1 و cdc2 در چرخه سلولی می‌شود و در نهایت چرخه را در مرحله G2/M متوقف می‌کند. یافته‌های دیگر نشانگر مهار فسفوریلاسیون Rb، کاهش بیان فاکتور رونویسی E2F، کاهش بیان سیکلین D1، کاهش بیان CDK های ۴ و ۶ و افزایش بیان سیکلین E می‌باشد (۲۲،۲۳). هم‌چنین در مطالعه قبلی فعال شدن ژن *p53* و جلوگیری از تکثیر سلول‌های MCF-7 با استفاده از عصاره گیاه شیرین‌بیان در رده سرطان پستان به اثبات رسید (۲۴). در پژوهش Del Poeta و همکاران نیز نشان داده شد که عصاره شیرین بیان باعث کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی *BCL2* و افزایش بیان ژن آپوپتوزی *BAX* به‌طور معنی‌داری در سلول‌های سران معده MKN-28 و به‌طور

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

متوسطی در دیگر سلول سرطان معده AGS می شود. بنابراین افزایش نسبت *BAX/BCL2* سبب آزاد شدن سیتوکروم C از فضای بین دو غشاء اندامک میتوکندری به سیتوزول شده و این امر منجربه فعال سازی کاسپاز اجرایی ۳ و القا آپوپتوز می‌شود (۲۵).

تغییرات ریخت‌شناسی مشاهده شده در سلول‌های HepG2 تیمار شده با عصاره ها احتمالاً بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) بوده که برای مشخص شدن آن نیاز به تست‌های بیشتری می‌باشد. امروزه، القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی یکی از راه‌بردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می‌رود. بنابراین پژوهش‌های سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهایی می‌باشد که به‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کند. مکانیسم های سلولی و مولکولی آپوپتوز که به دنبال عوامل مرگ یا آسیب‌های فیزیکی و شیمیایی ایجاد می‌شود، دارای دو مسیر خارجی و داخلی می‌باشد. در این دو مسیر، پروتئازهایی به نام کاسپازها نقش دارند که نهایتاً منجر به تغییرات ریخت شناسی مختلفی از جمله تراکم کروماتین، کوچک و جمع‌شدن سلول و قطعه قطعه شدن DNA می‌شوند (۲۶). آپوپتوز سلولی در حفظ هموستاز طبیعی بدن، کنترل تکثیر سلول‌ها و حذف سلول‌های غیر ضروری و مضر دخالت دارد. گزارشات حاکی از آن است که روند تشکیل بسیاری از سرطان‌ها از طریق اختلال در چندین مسیر پیام رسانی سلول رخ می دهد، که منجر مهار، تکثیر آپوپتوز و کاهش متاستاز می‌شود. در این پژوهش تفاوت اثرات عصاره های آبی و الکلی ریشه گیاه شیرین بیان بومی ایران در القاء آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی هوخست انجام گرفت. به‌طوری که تفاوت قطعه قطعه شدن هسته ها در گروه های تحت تیمار با عصاره نسبت به گروه کنترل به خوبی مشخص بود. که این اثرات در عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی بیشتر بوده است. بنابراین، در افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلولی در رده سلولی سرطانی کبد بیشتر بوده است. بنابراین با توجه به این که عصاره هایی که با حلال ها و روش های متفاوت از گیاه گرفته می شود، می تواند اثرات ضد سرطانی متفاوتی برروی یک رده سرطانی خاص داشته باشد، تفاوت مشاهده شده در مقاله حاضر قابل توجیه است.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار تفاوت اثرات سمیت و آپوپتوزی عصاره‌های الکلی و آبی ریشه گیاه شیرین‌بیان بومی ایران در رده سلولی سرطانی کبد بررسی گردید و مشاهده شد که اثرات عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی، در القاء مرگ برنامه‌ریزی شده آپوپتوزی سلولی بیشتر بوده است. لذا تحقیقات بیشتری جهت پتانسیل درمانی آینده این نوع عصاره پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد واحد ورامین-پیشوا می‌باشد و با حمایت مالی معاونت پژوهشی آن واحد انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان از کمک‌های جناب آقای دکتر عسگری و خانم‌بیگدلی سپاس‌گزاری می‌نمایند.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1- Shabkhiz MA, Eikani MH, Bashiri Sadr Z, Golmohammad F. ***Super-heated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root***. Food Chem 2016; 210(1): 396-401.

*2-*Shaker MK, Abdella HM, Khalifa MO, El Dorry A. ***Epidemiological characteristics of hepatocellular carcinoma in Egypt: a retrospective analysis of 1313 case***. Liver Int 2013; 33(10): 1601-06.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

*3-*Kim JU, Shariff MIF, Crossey MME, Gomez-Romero M, Holmes E, Cox IJ, et al. ***Hepatocellular carcinoma: Review of disease and tumor biomarkers.*** World J Hepatol 2016; 8(10): 471-84.

*4-*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): 4809-13.

*5-*Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, et al. ***Associations between hepatitis B virus genotype and mutantsand the risk of hepatocellular carcinoma.*** J Natl Cancer Inst 2008; 100(16): 1134-43.

*6-*Wang ZY, Nixon DW. ***Licorice and cancer.*** Nutr Cancer 2001; 39: 1-11.

*7-*Cheel J, Van Antwerpen P, Tůmová L, Onofre G, Vokurková D, Zouaoui-Boudjeltia K. ***Free radical scavenging, antioxidant and immune stimulating effects of a licorice infusion (Glycyrrhiza glabra L).*** Food Chem 2010; 122(3): 508-17.

*8-*Avijgan M, Mahboubi M, Moheb Nasab M, Ahmadi Nia E, Yousefi H. ***Synergistic activity between Echinophora platyloba DC ethanoic extract and azole drugs against clinical isolates of Candida albicans from women suffering chronic recurrent vaginitis.*** J Mycol Méd 2014; 24(2):112-16.

*9-*Bode AM, Dong Z. ***Chemopreventive Effectsof Licorice and Its Components.*** Current Pharmacol Reports 2015; 1(1): 60-71.

10- Karaoğul E, Parlar P, Parlar H, Alma MH. ***Enrichment of the glycyrrhizic acid from Licorice Roots (Glycyrrhiza glabra L.) by Isoelectric Focused Adsorptive Bubble Chromatography.*** J Analyt Methods in Chem 2016; 2016: 1-5.

11- Li YJ, Chen J, Li Y, Li Q, Zheng YF, Fu Y, et al. ***Screening and characterization of natural antioxidants in four Glycyrrhiza species by liquid chromatography occupied with electrospray ionization quadrupole time of flight tanned mass spectrometry.*** J Chromatogram 2011; 1218(45): 8181-91.

12- Soltani N, Karami R, Ranjbar M. ***The interaction of salicylic acid and cold stress on antioxidant enzyme activities in licorice Glycyrrhiza glabra.*** J Herbal Drugs 2011; 2(1): 7-13. [persian]

13- Venugopal K, Ahmad H, Manikandan E, Thanigai Arul K, Kavitha K, Moodley MK, et al. ***The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (Ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines***. J Photochem Photobiol B Biol 2017; 173: 99-107.

14- Salehi S, Mirzaie A, Shandiz SAS, Noorbazargan H, Rahimi A, Yarmohammadi S, et al. ***Chemical composition, antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of Artemisia marschalliana Sprengel extract***. Nat Prod Res 2017; 31: 469-72.[Persian]

15- Rezaiyan Gharagozlu N, Shandiz SAS, Baghbani-Arani F. ***Anti-cancer effects of aqueous and alcoholic licorice root extracts on human***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

hepatocarcinoma (HepG2) cell line. Med J Tabriz Uni Med Sci Health Services 2017; 40(2): 40-9.[Persian]

16- Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. ***Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments.*** Nanomedicine 2014; 10: 19-34.

17- Abolaji AO, Eteng MU, Ebong PE, Dar A, Farombi EO, Choudhary MI. ***Artemisia annua as a possible contraceptive agent: a clue from mammalian rat model.*** Nat Pro Res 2014; 28: 2342-46.

18- Zaidi SH, Huddart RA, Harrington KJ. ***Novel targeted radio sensitizers in cancer treatment***. Curr Drug Discov Technol 2009; 6(2): 103-34.

19- Basar N, Oridupa OA, Ritchie KJ, Nahar L, Osman NM, Stafford A, et al. ***Comparative cytotoxicity of Glycyrrhiza glabra Roots from Different Geographical Origins Against Immortal Human Keratinocyte (HaCaT), Lung Adenocarcinoma (A549) and Liver Carcinoma (HepG2) Cells.*** Phytother Res 2015; 29(6): 944-8.

20- Leyden JJ, Shergill B, Micali G, Downie J, Wallo W. ***Natural options for the management of hyperpigmentation.*** J Eur Acad Dermatol Venereol 2011; 25(10): 1140-5.

21- Chien CF, Wu YT, Tsai TH. ***Biological analysis of herbal medicines used for the treatment of liver diseases.*** Biomed Chromatogr 2011; 25(1-2): 21-38.

22- Fu Y, Hsieh TC, Guo J, Kunicki J, Lee MY, Darzynkiewicz Z, et al***. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (Glycyrrhiza glabra), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC- 3 prostate cancer cells***. Biochem Biophys Res Commun 2004; 322: 263-70.

23- 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): 4809-13.

24- Cheel J, Tumova L, Areche C, Antwerpen PV, Neve J, Zouaoui-Boudjeltia K, SanMartin A, et al. ***Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (Glycyrrhiza glabra L.), as influenced by harvest times.*** Acta Physiol Plant 2013; 35(4): 1337-49.

25- Del Poeta G, Bruno A, Del Principe MI, Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, et al. ***Deregulation of the Mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia***. Curr Cancer Drug Targets 2008; 8(3): 207-22.

26- Golder S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. ***Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment***. Asian Pac J Cancer Pre 2015; 16(6): 2129-44.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 11 | Feb 2019

Received: 10 Jan 2018
Accepted: 12 May 2018

Identification of the chemical constituents of aqueous and alcoholic *Glycyrrhiza glabra* root extracts and its comparative apoptotic study against human hepatocarcinoma cell line

Nima Rezaiyan Gharagozlu[1], Fahimeh Baghbani-Arani[†2], Seyed Ataollah Sadat Shandiz[3]

Original Article

Introdution: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers. It is the third leading cause of cancer related death. This study aimed to evaluate the phytochemical composition of ethanolic and aqueous *Glycyrrhiza glabra* root extracts its apoptotic effects against human hepatocarcinoma HepG2 cell line.

Methods: In the current experimental study, the phyochemical composition of aqueous and ethanolic *Glycyrrhiza glabra* extract was evaluated by GC/MS method. The $HepG_2$ cells were grown in $RPMI_{1640}$ supplemented with 10 % (v/v) FBS at 37°C with 5 %carbon dioxide (CO2) atmosphere. The cytotoxicity activities of extracts were measured using MTT after 24 hours. To evaluate the ability of extracts to trigger apoptosis in HepG2 cells, the Hosest8778 staining method was carried out.

Results: The phytochemical data of aqueous extract revealed 18 compounds, including Dodecane (13.34%) and 2',6'-Dihydroxyacetophenone bis (trimethylsilyl) ether (12.48%) as the major constitutes. The chemical composition of ethanolic extract showed 17 compounds, including Pentadecane (7.78%), 2,6,11,15-Tetramethylhexadecane (4.67%) as the prominent compounds. The MTT results revealed that the extract-treated cells had a dose-related toxicity effects. The results of Hoechst 33258 staining showed that the nuclear DNA fragmentation was increased in the ethanolic extract treatment compared to aqueous extract.

Conclusion: The ethanolic extract of *Glycyrrhiza glabra* possesses more apoptotic effect on cancer cells and further researches are needed for investigating its potential mechanism**.**

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, Liver cancer, Apoptosis, $HepG_2$.

Citation: Rezaiyan Gharagozlu N Baghbani-Arani F, Shandiz SAS. **Identification of the chemical constituents of aqueous and alcoholic *Glycyrrhiza glabra* root extracts and its comparative apoptotic study against human hepatocarcinoma cell line.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(11): 978-88

[1]Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[2]Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

[3]Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

***Corresponding author: Tel:** 021-36725011-14, **email:** fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v26i11.551]