

## ارزیابی تاثیر گلیسریتینیک اسید و گلیسریریزیک اسید مشتق از عصاره شیرین بیان بر رده سلولی آدنوکارسینوما معده

کبری مهدی نژادیانی<sup>1</sup>(MSc)، هدایت الله شیرزاد<sup>2</sup>(PhD)، شهره فخاری<sup>3</sup>(MSc)، علی جلیلی<sup>4</sup>(PhD)\*

- 1-مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- 2-گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
- 3-مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
- 4-مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

دریافت: 93/8/8، اصلاح: 93/11/15، پذیرش: 94/2/16

### خلاصه

**سابقه و هدف:** سرطان معده، دومین سرطان شایع می باشد که از روشهای متعددی همانند جراحی، شیمی درمانی و درمانی در درمان آن استفاده می شود. در اکثر موارد پاسخ به درمان ضعیف و با اثرات جانبی نامطلوب همراه است. عدم پاسخ به درمان، رشد سریع این بیماری محققین را به تلاش جهت دستیابی به داروهای موثرتر با اثرات جانبی کمتر واداشته است. شیرین بیان گیاهی با عوارض کم و خواص آنتی اکسیدانی بالایی می باشد که درطب سنتی برای درمان سرطان پیشنهاد شده است. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر ترکیبات شیرین بیان بر سلولهای آدنوکارسینوما معده انجام شده است.

**مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی رده سلولی AGS (Adenocarcinoma Gastric) از بانک سلولی تهیه و کشت داده شد. پس از پاساژ، سلولها به پلیتهای 96 تایی منتقل گردیدند. در هر خانه 2000 سلول در محیط RPMI1640 حاوی FBS (10%) قرار گرفت. سلولها درمجاورت غلظتهای مختلف ترکیبات گلیسریتینیک اسید (1/10، 1/100، 1/1000، 1/10000 میکرومولار) و گلیسریریزیک اسید (1/10، 1/100، 1/1000، 1/10000 میکرومولار) به مدت 24 و 48 ساعت به صورت تریپلیکیت قرار گرفتند و نتایج با گروه کنترل مقایسه شدند. **یافته‌ها:** یافته ها نشان می دهد، که هر دو ترکیب دارای اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان است. غلظت 100 میکرومولار برای گلیسریتینیک اسید در 24 ساعت با میانگین جذب نوری  $0/41 \pm 0/02$  و در مقابل کنترل  $0/79 \pm 0/04$  ( $p=0/0002$ ) و در 48 ساعت با میانگین جذب نوری  $0/16 \pm 0/004$  و در مقابل کنترل  $1/749 \pm 0/24$  ( $p=0/0003$ ) و بعد از 48 ساعت برای گلیسریریزیک اسید با میانگین جذب نوری  $0/78 \pm 0/53$  و در مقابل کنترل  $2/09 \pm 0/49$  ( $p=0/035$ ) معنی دار بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به تاثیر کشندگی و ترکیبات شیرین بیان، بررسی بیشتر از هر دوترکیب بعنوان ترکیبات موثر در سرطان معده پیشنهاد می شود.

**واژه‌های کلیدی:** گلیسریتینیک اسید، گلیسریریزیک اسید، شیرین بیان، آدنوکارسینوما معده.

### مقدمه

سرطان معده دومین سرطان شایع است و مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده که رتبه دوم مرگ و میر را در جهان بعد از سرطان ریه به خود اختصاص می دهد (1). در ایلات متحده آمریکا در سال 2014 آمار کلی مبتلایان به سرطان معده 1665540 نفر گزارش شده است که از این تعداد 585720 فوت کرده اند(2). سرطان معده در مراحل اولیه اغلب بدون علائم بالینی می باشد. فقدان علائم بالینی باعث به تاخیر افتادن تشخیص می شود بنابراین 80-90% این بیماران در مراحل پیشرفته بیماری مراجعه کرده که دارای متاستاز مجاور هستند. طبق مطالعات اپیدمیولوژی انجام شده شانس زنده بودن در مراحل پیشرفته همراه متاستاز با وجود شیمی درمانی و درمانهای تهاجمی مانند جراحی به مدت 5 سال، بسیار ضعیف بوده است (3). مطالعات اخیر توجه زیادی به استفاده از محصولات طبیعی در درمان بیماری های مختلف داشته و در این رابطه نتایج قابل توجهی از جمله تقویت سیستم ایمنی(4و5) درمان بیماریهای صعب العلاج از جمله آلزایمر(6و7) آترواسکلروز (8و9)، دیابت (10و11)، گوارش (12و13) و سرطان

(14و15) و امید زیادی برای پیشگیری و درمان این بیماریها را بوجود آورده است. شیرین بیان یکی از این گیاهان است که جهت درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیبات گرفته شده از ریشه شیرین بیان بخصوص فلاونوئیدهای گیاه در طیف وسیعی از بیماری های مختلف از جمله عفونت های میکروبی که باعث هیپاتیت C، زخم معده، عفونتهای پوستی و تنفسی می شود و همچنین در سرطان هم مورد استفاده قرار می گیرند (16). شیرین بیان با نام علمی Glycyrrhizaglabra از خانواده نخود ها میباشد. در طب سنتی آسیا و اروپا از این گیاه برای درمان گاستریت و عفونت های تنفسی و زخم های پپتیک استفاده می شد (16). این گیاه در تعداد زیادی از کشورها کشت می شود، و دارای اثرات ضد التهابی، ضد توموری و آنتی اکسیدانی است. فعالیتهای ضد توموری ترکیبات شیرین بیان شامل توقف چرخه سلولی، القا آپوپتوز و اثرات آنتی اکسیدانی می باشد. چندین ترکیب شیرین بیان با اتصال مستقیم مانع از فعالیتهای PI3-K، MKK4، MKK7، JNK1، mTOR و Cdk2 می شوند در نتیجه

این مقاله حاصل قسمتی از پایان نامه کبری مهدی نژادیانی دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره 1118 دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر علی جلیلی

E-mail: Ali130@gmail.com

آدرس: کردستان، سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه علوم پزشکی کردستان. تلفن: 087-33613129

افزایش شدند و به مدت یک شب در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار نگه داری گردید. سپس به هر چاهک غلظت های مختلفی از ترکیبات گلیسیریتینیک اسید (غلظتهای 0/1، 1، 10، 100 میکرومولار) و گلیسیریزیک اسید (غلظتهای 1، 10، 100 میکرومولار) که در DMSO حل شده بودند، اضافه شد، برای هر ترکیب یک گروه کنترل که فاقد ترکیبات مورد نظر بود و تنها شامل محیط کشت RPMI1640 حاوی 10% FBS بود مد نظر قرار گرفت. سلولها در زمانهای مختلف 24 و 48 ساعت با مقادیر مختلف دو ترکیب انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون به هر چاهک 10 میکرولیتر XTT (نمک 2و3 بیس-2) متوکس-4 نیترو-5 سولفو فنیل) 2 تترازولیم-5 کربوکسانیلید) به منظور بررسی میزان بقای سلولها اضافه شد. بعد از گذشت دوره زمانی 4 ساعته خوانش مایع رویی با استفاده از الیزا (Stat Fax, Palm City, FL) انجام و میزان جذب نوری با طول موج 540 نانومتر در هر چاهک بررسی گردید (12). جذب نوری ثبت شده توسط الیزا با استفاده از فرمول زیر به درصد بقای سلولی تبدیل شد.

#### 100×(جذب کنترل/جذب تست)=درصد بقای سلولی

تمامی آزمایشات 3 مرتبه تکرار گردیدند به این صورت که برای هر دو ترکیب گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید در هر دو زمان 24 و 48 ساعت برای هر کدام از غلظتهای مورد نظر تریپلیکیت گذاشته شد و از نتایج جذب نوری میانگین گرفته شد و سپس آنالیز آماری در هر مورد انجام گردید.

**آنالیز آماری:** با توجه به داشتن مقادیر مختلف و زمانهای مختلف جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS 16، آزمون کروسکال والیس و آزمون تعقیبی دان استفاده شد و  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

**نتایج حاصل از انکوباسیون سلول های AGS با دوزهای مختلف گلیسیریتینیک اسید در دو زمان 24 و 48 ساعته:** به دنبال انکوباسیون 24 ساعته سلول های AGS با دوزهای مختلف گلیسیریتینیک اسید شامل (غلظتهای 0/1، 1، 10، 100 میکرومولار) کمترین درصد بقای سلول توسط غلظت 100 میکرومولار این ترکیب با میانگین جذب نوری  $0/41 \pm 0/02$  مشاهده گردید که از لحاظ آماری در مقابل با گروه کنترل با میانگین جذب نوری  $0/79 \pm 0/04$  با  $p = 0/0002$  و 95% CI معنی دار بود (نمودار 1- الف). از طرف دیگر نتایج بدست آمده نشان می دهد انکوباسیون 48 ساعته سلولهای AGS با دوزهای مختلف گلیسیریتینیک اسید شامل (غلظتهای 1، 10، 100 میکرومولار)، کمترین درصد بقای سلول توسط غلظت 100 میکرومولار این ترکیب با میانگین جذب نوری  $0/16 \pm 0/004$  مشاهده گردید که از لحاظ آماری در مقابل با گروه کنترل با میانگین جذب نوری  $1/749 \pm 0/24$  با  $p = 0/0003$  و 95% CI معنی دار بود (نمودار 1- ب).

**نتایج حاصل از انکوباسیون سلول های AGS با دوزهای مختلف گلیسیریزیک اسید در دو زمان 24 و 48 ساعته:** انکوباسیون 24 ساعته این سلولها با غلظتهای مختلف شامل (غلظتهای 0/1، 1، 10، 100 میکرومولار) ترکیب دیگر یعنی گلیسیریزیک اسید نشان داد که کمترین درصد بقای سلول توسط غلظت 100 میکرومولار این ترکیب با میانگین جذب نوری  $0/33 \pm 0/29$  مشاهده گردید اگرچه از لحاظ آماری در مقابل با گروه کنترل با میانگین جذب

باعث کاهش کارسینوژن در چندین سلول و مدل های موشی می شود (4). همچنین از این گیاه در درمان هپاتیت های ویروسی و عفونت ویروس سایتومگال نیز استفاده می شود. گلیسیریزیک اسید موجود در شیرین بیان سبب مهار رشد ویروسها و غیرفعال شدن اجزای ویروسی می شود (5و6). گلیسیریتینیک اسید (Glycyrrhithic Acid) و گلیسیریزیک اسید (Glycyrrhizic Acid) دو ترکیب جدا شده از گیاه شیرین بیان هستند. گلیسیریتینیک اسیدیک تری ترپنوئید اسید 5 ضلعی ارگانیک مشتق شده از گلیسیریزیک اسید با فرمول ساختاری  $C_{30}H_{46}O_4$  می باشد. گلیسیریزیک اسیدیک ماده طبیعی مشتق شده از گیاه شیرین بیان است، گلیسیریزیک اسیداز گلیسیریتینیک اسیدو دو مولکول اسید گلوکورونیک تشکیل شده است (7). گلیسیریزیک اسید و گلیسیریتینیک اسید موجود در عصاره شیرین بیان احتمالاً با تأثیر بر گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی روی فعالیت استروئیدهای آندوژن تأثیر می گذارند و در کبد و کلیه از تبدیل کورتیزول به کورتیزون جلوگیری می کنند. همچنین ترکیبات موجود در عصاره شیرین بیان احتمالاً موجب وقفه لیپواکسیژناز، سیکلو اکسیژناز و کاهش اسید آراشیدونیک می گردند، گلیسیریتینیک اسید در کلینیک به عنوان ضد درد و ضد التهاب، درمان آلرژی، درمان زخم معده، درمان هپاتیت و ضد سمیت کبدی و ضد تومور استفاده می شود. همچنین این ترکیب یکی از ترکیبات فعال دارویی شیرین بیان است و فعالیت های بسیاری نظیر افزایش سطح کورتیکواسترون را نشان می دهد که به کاهش چربی کمک می کند (8و9).

گلیسیریتینیک اسید در موش از آغاز و پیشرفت تومور بوسیله DMBA (7,12-DiMethyl Benz(a)Anthracene) (ترانس 7 و 12 دی متیل بنزن) و TPA (12-o-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetate) (تترا دکانوئیل فوربل 13 استات) جلوگیری میکند (10)، در حالی که گلیسیریزیک اسید از آغاز تومور بوسیله DMBA (7,12-DiMethyl Benz(a)Anthracene) (ترانس 7- و 12 دی متیل بنزن) جلوگیری میکند و TPA نقشی ندارد (11). در این تحقیق با توجه به اثرات ترکیبات شیرین بیان و عوارض جانبی کمتر آن در درمان بیماری های مختلف، اثر کشندگی گلیسیریزیک اسید و گلیسیریتینیک اسید مشتق شده از شیرین بیان بر روی رده سلولی AGS سرطان معده در غلظتهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

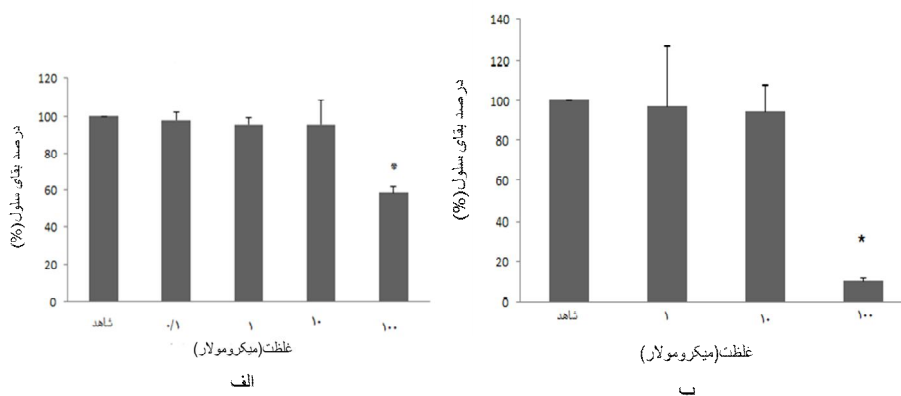
### مواد و روش ها

**کشت سلولی:** در این مطالعه تجربی ترکیبات گلیسیریتینیک اسید و گلیسیریزیک اسید از شرکت سیگما و رده سلول سرطانی AGS (سلولهای اپیتلیال کارسینومای معده) از انستیتو پاستور (تهران-ایران) خریداری شدند. سلولها در فلاسکهای 25 میلی لیتری حاوی 5 میلی لیتر محیط کشت کامل RPMI 10% FBS-40 (Gibco, Manchester, UK) کشت داده شدند و در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد حاوی 5% CO<sub>2</sub> انکوبه شدند و هر 24 ساعت یکبار تعویض محیط صورت گرفت. 3-4 روز بعد از کشت اولیه در زیر میکروسکوپ معکوس تراکم سلولی بررسی و در صورتی که رشد سلولها به حد 80% می رسید پاساژ انجام می شد.

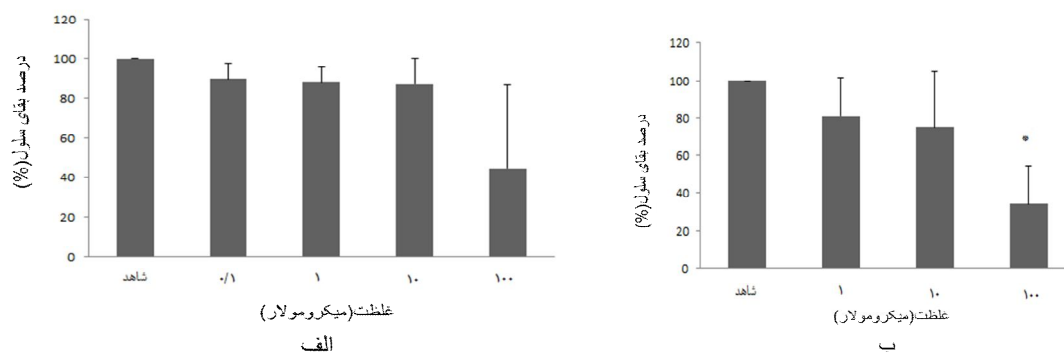
**زیست پذیری سلول:** تعداد 2000 سلول در 50 میکرولیتر محیط کشت RPMI1640 حاوی 10% FBS موجود در هر چاهک از پلیت 96 تایی

نوری  $0/81 \pm 0/08$  تفاوت معنی داری مشاهده نشده است (نمودار 2-الف). با این وجود با انکوباسیون 48 ساعته این سلولها با غلظتهای مختلف گلیسیریزیک اسید (غلظتهای 1، 10، 100 میکرومولار)، در غلظت 100 میکرومولار این ترکیب با میانگین جذب نوری  $0/78 \pm 0/53$  شاهد کمترین درصد بقای سلول بودیم و از لحاظ آماری در مقابل با گروه کنترل با میانگین جذب نوری  $2/09 \pm 0/49$  با

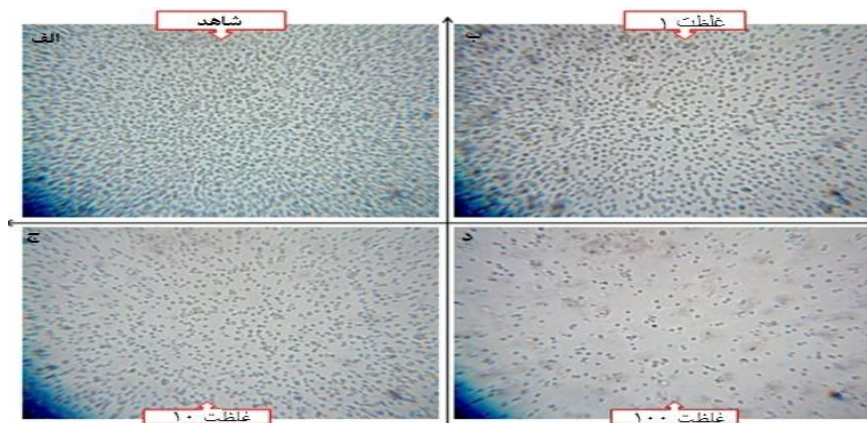
نوری  $0/81 \pm 0/08$  تفاوت معنی داری مشاهده نشده است (نمودار 2-الف). با این وجود با انکوباسیون 48 ساعته این سلولها با غلظتهای مختلف گلیسیریزیک اسید (غلظتهای 1، 10، 100 میکرومولار)، در غلظت 100 میکرومولار این ترکیب با میانگین جذب نوری  $0/78 \pm 0/53$  شاهد کمترین درصد بقای سلول بودیم و از لحاظ آماری در مقابل با گروه کنترل با میانگین جذب نوری  $2/09 \pm 0/49$  با



نمودار 1، الف: درصد بقای سلولهای AGS پس از 24 ساعت مجاورت با مقادیر مختلف گلیسیریتینیک اسید ب: درصد بقای سلولهای AGS پس از 48 ساعت مجاورت با مقادیر مختلف گلیسیریتینیک اسید. \*اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ ) بین گروه کنترل و گروه با غلظت 100 میکرومولار را در مجاورت 24 و 48 ساعت با گلیسیریتینیک اسید نشان می دهد.



نمودار 2، الف: درصد بقای سلولهای AGS پس از 24 ساعت مجاورت با مقادیر مختلف داروی گلیسیریزیک اسید: اختلاف معنی داری ( $p < 0/05$ ) بین گروه کنترل و سایر گروههای مورد مطالعه دیده نشده است. ب: درصد بقای سلولهای AGS پس از 48 ساعت مجاورت با مقادیر مختلف داروی گلیسیریزیک اسید. \*اختلاف معنی دار ( $p < 0/05$ ) بین گروه کنترل و گروه با غلظت 100 میکرومولار در مجاورت 48 ساعت با گلیسیریزیک اسید را نشان می دهد.



شکل 2، کاهش تعداد سلول های سرطانی AGS نشان دهنده افزایش میزان مرگ سلولی با افزایش دوز ترکیب است که بیشترین میزان مرگ سلولی در غلظت 100 میکرومولار در شکل (د) مشاهده می شود (غلظت بر حسب میکرومولار)

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه شاهد افزایش مرگ سلولهای سرطانی AGS تحت تاثیر دو ترکیب مشتق شده از شیرین بیان تحت عنوان گلیسیریزیک اسید و گلیسیریتینیک اسید در دو زمان انکوباسیون 24 و 48 ساعته بودیم. در یک بررسی که جهت مشاهده اثر گلیسیریتینیک اسید روی سلولهای NCI-H460 NSCLC انجام شده است، شاهد آپوپتوز و توقف سیکل سلولی در مرحله G1 بوده ایم که علت آن را افزایش بیان PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) (زنجیره پلی ریپوز آدنین دی نوکلئید فسفات) و کاسپاز 3 و همچنین کاهش Bcl-XL, Bcl2, سیکلین D1 و سیکلین E بیان کرده اند. همچنین گلیسیریتینیک اسید باعث کاهش فسفریلاسیون پروتئین کیناز C ( $PKC\alpha, \beta$ ) و پروتئین کیناز فعال شده خارج سلولی (ERK) و افزایش فسفریلاسیون پروتئین کیناز  $\delta$  و JNKs (این دو روی مرگ سلولی اثر می گذارند) می شود (13). با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه و نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر به نظر می رسد چنین مکانیسم های احتمالی در این پروسه مذکور دخیل می باشد. در بررسی اثرات ضد سرطانی اجزاء عصاره شیرین بیان بر روی سلول های سرطانی معده و سلول های نامیرای اپتلیوم معده مشاهده کردند که جزء A عصاره شیرین بیان (Licorhaleone A)، کشنده ترین جزء عصاره بوده و بیشترین تاثیر را بر متوقف کردن چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس دارد. نتایج مطالعه این محققان حاکی از آن بود که جزء A عصاره شیرین بیان در یک مقدار وابسته به دوز از رشد سلول های سرطان معده جلوگیری می کند. همچنین این گروه گزارش کردند که جزء A عصاره شیرین بیان سبب کاهش بیان سیکلین A، سیکلین B و MDM2 (Murine Double Minute Oncogene) و افزایش بیان پروتئین رتینوبلاستوما (Rb) در سلولهای نامبرده می شود. به علاوه جزء مذکور عصاره شیرین بیان با تاثیر بر روی بیان Bcl-2 و Bax و کاسپاز 3 منجر به آپوپتوزیس شده بنابراین این یافته ها نشان دهنده اثرات درمانی عصاره شیرین بیان بر روی سرطان معده می باشد (14). در تحقیق دیگری نشان داده شد که عصاره شیرین بیان موجب افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl2 به میزان چشمگیری در سلولهای MKN-28 و به طور متوسطی در سلول های AGS و به میزان کمی در سلول های MKN-45 می شود. در نتیجه افزایش در نسبت

Bax/Bcl-2 سبب تحریک آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول می شود، جایی که سیتوکروم C می تواند به-1 APAF (Apoptotic Protease Activating Factor1) (فاکتور فعال کننده پروتئاز آپوپتیک 1) متصل شود. این پدیده منجر به فعال شدن کاسپاز 3 و PARP (زنجیره پلی ریپوز آدنین دی نوکلئید فسفات) و القاء آپوپتوز سلولها می شود (15). نتایج تحقیق حاضر اثرات کشندگی دو ترکیب شیرین بیان را بخوبی نشان داده است. با توجه به تاثیر بیشتر گلیسیریتینیک اسید، شاید بتوان از آن بعنوان ترکیب موثر درمانی در سرطان معده استفاده کرد اگر چه ترکیب گلیسیریزیک اسید نیز از رشد سلولهای سرطانی جلوگیری میکند ولی نسبت به گلیسیریتینیک اسید در مدت زمان طولانی تری دارای تاثیر بوده است چنین یافته ای را می توان با توجه به این نکته که هر کدام از این ترکیبات مسیرهای مختلفی را برای جلوگیری از رشد سلول بکار برده و دارای اثرات مختلفی روی رده سلولی AGS هستند، می توان توجیه کرد. اثر استرس اکسیداتیو در بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان به اثبات رسیده است (16-18). آنتی اکسیدان ها نیز در بیماری های مختلف بخصوص بیماری هایی که به رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو ارتباط پیدا می کنند مثل سرطان (19 و 20)، دیابت (21-23)، عفونت (24 و 25) و اترواسکلروز (26 و 27) مطالعه شده است. بنابراین ممکن است اثر آنتی اکسیدانی این مواد نیز در اثر ضد سرطانی آنها موثر باشد. البته تعداد زیادی از گیاهان وجود دارند که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند (28-31). لذا این دسته از گیاهان نیز ممکن است اثر ضد سرطان داشته باشند که بایستی مورد آزمایش قرار گیرند. یافته های حاصل نشان می دهد با توجه به اینکه احتمالاً ترکیب گلیسیریتینیک اسید در مدت زمان کمتری بیشترین تاثیر را داشته، احتمالاً بتواند بعنوان یک ترکیب موثر درمانی در سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه باید از تاثیر مثبت این ترکیبات در درمان سرطان معده با مطالعات بیشتر در شرایط داخل بدن (in vivo) آگاه شد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد و سنجند و همچنین از آقای دکتر محمود رفیعیان تقدیر و تشکر می گردد.

## An Evaluation the Effect of Glycyrrhetic and Glycyrrhizic Acids Derived from Licorice Extract on Gastric Cancer Cell Lines

K. Mehdinejadiani (MSc)<sup>1</sup>, H. Shirzad (PhD)<sup>2</sup>, Sh. Fakhari (MSc)<sup>3</sup>, A. Jalili (PhD)<sup>\*4</sup>

1.Cellular-Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran

2.Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R.Iran

3.Immunology Research Center, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, I.R.Iran

4.Liver & Digestive Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, I.R.Iran

J BabolUniv Med Sci; 17(9);Sep 2015; PP:52-8

Received: Oct 30<sup>th</sup> 2014, Revised: Feb 4<sup>th</sup> 2015, Accepted: May 6<sup>th</sup> 2015.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Gastric cancer is the second most prevalent carcinogenic disease and surgery, chemotherapy and radiation are its principal treatment modalities. However, in most cases, poor response to treatment and adverse side effects are observed regarding these modalities. Given the lack of response to treatment and growing rates of gastric cancer, researchers are trying to come up with more efficient treatments with fewer side effects. In the traditional medicine, licorice has been suggested as a cancer treatment considering its high antioxidant properties and few side effects. This study aimed to evaluate the effect of licorice extract on gastric cancer cell lines.

**METHODS:** In this experimental study, adenocarcinoma gastric cell lines were prepared from cell bank and were cultured. After passage, the cells were transferred into a 96-well plate. In each well, approximately 2,000 cells in RPMI-1640 culture medium with FBS (10%) were placed. The cells were repeatedly exposed to different concentrations of Glycyrrhetic acid (0, 1, 10 and 100.1  $\mu$ M) and Glycyrrhizic acid (10, 1, 100 and 0.1  $\mu$ M) for 24 and 48 hours. Finally, the obtained results of the experimental and control groups were compared with each other.

**FINDINGS:** According to our results, the toxic effect of Glycyrrhetic and Glycyrrhizic acids is dose and time dependent. In 24 hours, the mean optical density (MOD) in 100  $\mu$ M concentration of Glycyrrhetic acid was  $0.41 \pm 0.02$  and  $0.79 \pm 0.04$  in the experimental and control groups, respectively ( $p=0.0002$ ). After 48 hours, MOD was  $0.16 \pm 0.004$  and  $1.749 \pm 0.24$  in the experimental and control groups, respectively ( $p=0.0003$ ). Moreover, the MOD of 100  $\mu$ M concentration of Glycyrrhizic acid was  $0.78 \pm 0.53$  and  $2.09 \pm 0.49$  in the experimental and control groups in 48 hours. There was a significant difference between the experimental and control groups ( $p=0.035$ ).

**CONCLUSION:** The results of this study demonstrated that the licorice compounds have a toxic effect on carcinogenic cells. Therefore, it is recommended to perform more study on both Glycyrrhizic and Glycyrrhizic acids as effective compounds on gastric cancer treatment.

**KEY WORDS:** Gastric Cancer, Glycyrrhetic Acid, Glycyrrhizic Acid, Licorice.

Please cite this article as follows:

Mehdinejadiani K, Shirzad H, Fakhari Sh, Jalili A. An Evaluation the Effect of Glycyrrhetic and Glycyrrhizic Acids Derived from Licorice Extract on Gastric Cancer Cell Lines. J BabolUniv Med Sci. 2015;17(9):52-8.

\*Corresponding Author: A. Jalili (PhD)

Address: Kurdistan University of Medical Sciences, Pasdaran Boulevard, Sanandaj, I.R.Iran

Tel: +98 87 33613129

Email: Ali130@gmail.com



## References

1. Weis VG, Goldenring JR. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. *Gastric Cancer*. 2009;12(4):189-97.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
3. Oliveira FJ, Ferrão H, Furtado E, Batista H, Conceição L. Early gastric cancer: report of 58 cases. *Gastric Cancer*. 1998;1(1):51-6.
4. Bode AM, Dong Z. Chemopreventive effects of licorice and its components. *Curr Pharmacol Rep*. 2015;1(1):60-71.
5. Lehtihet M, Nygren A. Licorice--an old drug and currently a candy with metabolic effects]. *Läkartidningen*. 2000;97(36):3892.
6. Arora R, Chawla R, Marwah R, Arora P, Sharma R, Kaushik V, et al. Potential of complementary and alternative medicine in preventive management of novel H1N1 flu (Swine flu) pandemic: thwarting potential disasters in the Bud. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2010;2011.
7. Gottschalck TE, McEwen NM. *International cosmetic ingredient dictionary and handbook*. 10th ed. Washington DC: CTFA; 2004.
8. Whorwood CB, Sheppard MC, Stewart PM. Licorice inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action. *Endocrinology*. 1993;132(6):2287-92.
9. Armanini D, De Palo CB, Mattarello MJ, Spinella P, Zaccaria M, Ermolao A, et al. Effect of licorice on the reduction of body fat mass in healthy subjects. *J Endocrinol Invest*. 2003;26(7):646-50.
10. Wang ZY, Agarwal R, Zhou ZC, Bickers DR, Mukhtar H. Inhibition of mutagenicity in salmonella typhimurium and skin tumor initiating and tumor promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetic acid: comparison of 18 $\alpha$ - and 18 $\beta$ -stereoisomers. *Carcinogenesis*. 1991;12(2):187-92.
11. Agarwal R, Wang ZY, Mukhtar H. Inhibition of mouse skin tumor initiating activity of DBMA by chronic oral feeding of glycyrrhizin in drinking water. *Nutr Cancer*. 1991;15(3-4):187-93.
12. Pirzadeh S, Fakhari S, Jalili A, Mirzai S, Ghaderi B, Haghshenas V. Glycyrrhetic acid induces apoptosis in leukemic HL60 cells through upregulating of CD95/CD178. *Int J Mol Cell Med*. 2014;3(4):272-8.
13. Song J, Ko HS, Sohn EJ, Kim B, Kim JH, Kim HJ, et al. Inhibition of protein kinase C  $\alpha/\beta$ II and activation of c-Jun NH2-terminal kinase mediate glycyrrhetic acid induced apoptosis in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(4):1188-91.
14. Xiao XY, Hao M, Yang XY, Ba Q, Li M, Ni SJ, et al. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Lett*. 2011;302(1):69-75.
15. 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.
16. Darani HY, Shirzad H, Mansoori F, Zabardast N, Mahmoodzadeh M. Effects of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model. *The Korean journal of parasitology*. 2009;47(2):175-7.
17. Bagheri N, Rahimian Gh, Salimzadeh L, Azadegan F, Rafieian-Kopaei M, Taghikhani A, et al. Association of the virulence factors of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal interleukin-17/23 mRNA expression in dyspeptic patients. *EXCLI J*. 2013;12:5-14.
18. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, Azadegan-Dehkordi F, Taghikhani A, Salimzadeh L, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* vacA increase markedly gastric mucosal TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in gastritis patients. *Microb Pathog*. 2014;67-68:1-7.

19. Shirzad H, Kiani M, Shirzad M. Impacts of tomato extract on the mice fibrosarcoma cells. *J HerbMed Pharmacol*. 2013;2(1):13-6.
20. Shirzad H, Taji F, Rafieian-Kopaei M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. *J Med Food*. 2011;14(9):969-74.
21. Asgary S, Rafieian-Kopaei M, Shamsi F, Najafi S, Sahebkar A. Biochemical and histopathological study of the anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) in alloxan-induced diabetic rats. *J Complement Integr Med*. 2014;11(2):63-9.
22. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Protective effects of herbal antioxidants on diabetic kidney disease. *J Res Med Sci*. 2014;19(1):82-3.
23. Rafieian-Kopaei M, Nasri H. The ameliorative effect of *Zingiber officinale* in diabetic nephropathy. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(5):e11324.
24. Asadi-Samani M, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7 S1: S22-8.
25. Bahmani M, Rafieian-Kopaei M, Hassanzadazar H, Saki K, Karamati SA, Delfan B. A review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7 S1: S29-33.
26. Madihi Y, Merrikhi A, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M, Shahinfard N, Ansari R, et al. Impact of Sumac on postprandial high-fat oxidative stress. *Pak J Med Sci*. 2013;29(Suppl 1):340-5.
27. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927-46.
28. Asgary S, Kelishadi R, Rafieian-Kopaei M, Najafi S, Najafi M, Sahebkar A. Investigation of the lipid-modifying and antiinflammatory effects of *Cornus mas* L. supplementation on dyslipidemic children and adolescents. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(7):1729-35.
29. Delfan B, Bahmani M, Hassanzadazar H, Saki K, Rafieian-Kopaei M. Identification of medicinal plants affecting on headaches and migraines in Lorestan Province, West of Iran. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7 S1:S376-9.
30. Khosravi-Boroujeni H, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Sajjadi F, Maghroun M, Asgari S, et al. White rice consumption and CVD risk factors among Iranian population. *J Health Popul Nutr*. 2013;31(2):252-61.
31. Bahmani M, Saki K, Rafieian-Kopaei M, Karamati SA, Eftekhari Z, Jelodari M. The most common herbal medicines affecting *Sarcomastigophora* branches: a review study. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7 S1:S14-21.