DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

تغییرات بیان ژن آدنوزین دآمیناز (*ADA*) در سلولهای سرطان پستان انسانی رده‌های MCF-7 و MDA-MB-231 و سلولهای رده نرمال MCF-10A تیمار شده با عصاره شیرین بیان

اکبر صفی پور افشار*، فاطمه سعید نعمت پور و امیر شیرزاد

ایران، نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

چکیده

آنزیم آدنوزین دآمیناز (*ADA*) در متابولیسم پورینها شرکت داشته و نقش اساسی در تکثیر و بلوغ سلولهای پستانداران دارد و همچنین فعالیت آن در سلولهای سرطان پستان افزایش می‌یابد. در این پژوهش اثر عصاره آبی ریشه گیاه شیرین‌بیان بر درصد زنده‌مانی و بیان ژن *ADA* در دو رده سرطانی پستان انسانی MCF-7 و MDA-MB-231 و همچنین یک رده نرمال MCF-10A مورد مطالعه قرار گرفت. سمیت سلولی عصاره آبی شیرین‌بیان به روش رنگ سنجی MTT بررسی گردید و بیان ژن *ADA* با روش Real-time PCR سنجیده شد. با افزایش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلولها به ویژه در رده‌های سرطانی به طور معنی‌داری کاهش یافت و همچنین بیان ژن *ADA* در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره در رده‌های MCF-7 و MDA-MB-231 به ترتیب به میزان ۴ و ۴/۸ برابر کاهش پیدا کرد. نتایج بیانگر آن است که عصاره این گیاه با کاهش بیان ژن *ADA* سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلولهای سرطانی پستان شده است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، شیرین‌بیان، آدنوزین دآمیناز، کشت سلول

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۵۱۶۶۱۳۳۹۰۵ ، پست الکترونیکی: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان، بیشترین سرطان تشخیص داده شده و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در میان زنان است (۱۹). بر اساس گزارش وزارت بهداشت ایران، سرطان پستان با ۲۸/۲۵ درصد ابتلا، شایع‌ترین سرطان در میان زنان ایرانی است و میانگین سنی سرطان پستان در ایران ۱۰ تا ۱۵ سال پایین‌تر از کشورهای توسعه یافته و میانگین سنی جهان است (۱۲). نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که میانگین سنی بیماران مبتلا به سرطان پستان ۴۰ تا ۵۰ سال است (۱۹). حدود ۲۳ درصد سرطانهای پستان در ایران در سن کمتر از ۴۰ سالگی اتفاق می‌افتد و ۷۰ درصد آنها در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده شده است (۱۳). این در حالی است که تشخیص زود هنگام این بیماری به ویژه در مراحل اول در کاهش مرگ و میر بسیار اهمیت دارد (۱۰). به دلیل تغییر در فعالیت آنزیمهای توموری و به منظور شناسایی سریع تر سرطان پستان ، مطالعات متعددی بر فعالیتهای آنزیمی متمرکز شده است. در این بین آنزیمهای درگیر در متابولیسم پورینها، به طور خاص آنزیم آدنوزین دآمیناز (EC 3.5.4.4) مورد مناسب به شمار می‌رود (۳ و ۴).

آنزیم آدنوزین دآمیناز در متابولیسم پورینها شرکت دارد و واکنش هیدرولیز آدنوزین به اینوزین را کاتالیز می‌کند (۱۷). این آنزیم در توسعه و نگهداری سیستم ایمنی بدن نقش اساسی دارد، به علاوه آنزیم آدنوزین دآمیناز نقش

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

اساسی در تکثیر و بلوغ سلولهای پستانداران دارد و آنزیمی کلیدی در متابولیسمهای هسته‌ای به شمار می‌رود. به دلیل اینکه واکنش کاتالیز شده توسط این آنزیم یک طرفه و غیر قابل بازگشت می‌باشد، آدنوزین دآمیناز، آنزیم کلیدی در تجزیه آدنوزین می‌باشد. ژن آدنوزین دآمیناز بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۲۰ و در موقعیت ۱۳۱۲ قرار دارد (20q13.12). طول توالی این ژن ۳۲۱۶۸ جفت باز و تعداد اگزونهای آن ۱۲ عدد می‌باشد. جهشهای مختلفی برای این ژن شرح داده شده است که با بیماریهای انسان در ارتباط است. کمبود در این آنزیم باعث یک بیماری نقص ایمنی ترکیبی شدید (SCID) می‌شود که در آن اختلال عملکرد هر دو لنفوسیتهای B و T همراه با اختلال ایمنی سلولی و کاهش تولید ایمونوگلوبولین دیده می‌شود، در حالی که سطوح بالای این آنزیم با کم خونی همولیتیک مادرزادی همراه است. گزارشهای متعدد حاکی از این است که در سلولهای سرطان پستان فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (۲۲). بنابراین، کاهش بیان ژن *ADA* و فعالیت آنزیم مربوطه می‌تواند یک استراتژی مناسب برای درمان سرطان پستان باشد (۱).

گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) گیاهی مدیترانه‌ای بوده و از جنوب اروپا تا آسیای مرکزی میان دو عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۴۵ درجه نیمکره شمالی رویش دارد. در ایران نیز تقریباً در تمام شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به وفور یافت می‌شود. این گیاه چند ساله، از طایفه Astragaleae، زیر تیره Papilionacea و تیره Fabaceae می‌باشد (۷). ریشه شیرین‌بیان دارای ترکیبات متعددی نظیر قندهای مختلف (تا ۱۸ درصد)، فلاوونوئیدها، استرولها، اسیدهای آمینه، صمغ و نشاسته، اسانسهای روغنی و ساپونینها می‌باشد (۲۱). از شیرین بیان در طب سنتی آسیا و اروپا برای درمان گاستریت، عفونتهای تنفسی، زخمهای پپتیک، هپاتیت، رشد تومور و بیماریهای قلبی استفاده می‌شود. در طب سنتی ایران نیز گیاه شیرین بیان به عنوان درمان ورم معده و ضدسرفه استفاده می‌شده است (۱۱). امروزه نیز عصاره شیرین‌بیان یکی از اجزای ترکیبی شربت سرفه به شمار می‌رود. همچنین به عنوان داروی مسکن در التهابهای پوستی و برای درمان اسپاسم، تورم و روماتیسم کاربرد دارد. خواص ضدسرطانی نیز برای این گیاه گزارش شده است (۲۰). برخی از ترکیبات این گیاه اثرات ضدسرطانی و برخی اثرات مهار آنزیمها را بر عهده دارند. وجود ترکیبات کاهش دهنده چربی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی‌اکسیدان قوی در این گیاه گزارش شده است. اثرات سمیت سلولی عصاره شیرین‌بیان نیز بررسی شده است (۱۸).

با توجه به ضرورت استفاده از داروهای با منشاء طبیعی، هدف تحقیق پیش‌رو ارزیابی اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر میزان بیان ژن *ADA* و تکثیر سلولی در سلولهای سرطانی پستان و مقایسه آن با سلولهای سالم است.

مواد و روشها

تهیه مواد: مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکتهای USA (Sigma) و Merk (Germany) تهیه گردید. مواد و آنزیمهای کاربردی در بیولوژی مولکولی از سینا ژن (ایران) و ABI (USA)، همچنین کیتها و مواد مورد استفاده در RT-PCR از شرکت فرمنتاز(fermentas) تهیه شد.

کشت سلول: در این طرح 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 پلیتهای ۲۵ سانتیمتر مکعب در انکوباتور CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد در محیط کشت DMEM به علاوه ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند.

تهیه عصاره آبی: برای تهیه عصاره آبی ۵۰ گرم ریشه گیاه شیرین‌بیان در محفظه دستگاه سوکسله قرار داده شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

عصاره گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت و پس از تبخیر کردن آب به وسیله دستگاه روتاری، عصاره پودر شده به فریزر ۲۰- منتقل شد. در این پژوهش از غلظتهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره استفاده شد. جهت تهیه این غلظتها ابتدا یک محلول اصلی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره خشک حل شده در DMSO ۱ درصد تهیه و برای ساخت سایر غلظتها استفاده شد. برای غلظت صفر از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

تست MTT: برای انجام تست MTT پس از شمارش سلولها، ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شد و پس از پایداری سلولها، تیمار برای ۷۲ ساعت با غلظتهای تهیه شده و کنترلها انجام گردید. سپس رنگ آمیزی با MTT ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انجام و جذب نوری با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۴۵-۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین درصد زنده‌مانی، میانگین جذبهای نوری سلولهای تیمار شده با عصاره بر میانگین جذب‌های نوری محلول معادل DMSO تقسیم و در نهایت عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. به منظور محاسبه IC_{50} عصاره‌ها از نرم افزار Prism 5.0 استفاده شد.

بررسی میزان بیان ژن *ADA*: به منظور بررسی بیان ژن مورد مطالعه، تیمار برای ۴۸ ساعت با غلظتهای تهیه شده از عصاره آبی شیرین‌بیان برای سلولهای هر ۳ رده سلولی با ۳ تکرار انجام گردید. برای طراحی آغازگرهای ویژه ژن آدنین دآمیناز (*ADA*) و بتا اکتین (*ACTB*) از توالی مربوط به mRNA این ژنها که در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ترتیب با شماره دسترسی NM_000022.2 و NM_001101.3 موجود است، استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *ADA* و *ACTB*

نام آغازگر	توالی ´3 - ´5	طول نوکلئوتیدی	دمای ذوب (°C)	طول قطعه تکثیر شده
ADA-FW	ACCAGGCTAACTACTCGCTCAA	۲۲	۶۱	۱۰۰
ADA-RV	TCAGTAAAGCCCATGTCCCGTT	۲۲	۶۱	
ACT-FW	TCCATCATGAAGTGTGACGT	۲۰	۶۰	۱۵۴
ACT-RV	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	۲۲	۶۰	

مقایسه نسبی بیان ژن *ADA* با استفاده از روش Real Time SYBER Green PCR با استفاده از دستگاه ABI Step-One (Applied Biosystems) صورت گرفت. cDNA ساخته شده به عنوان الگو برای واکنشهای qRT – PCR تحت شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه در واسرشته سازی اولیه و سپس در ۴۰ چرخه، ۱۵ ثانیه القای دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته سازی و پس از آن ۶۰ ثانیه القای دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمر و طویل شدن با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژنها در نظر گرفته شد و ژن بتا اکتین هم به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

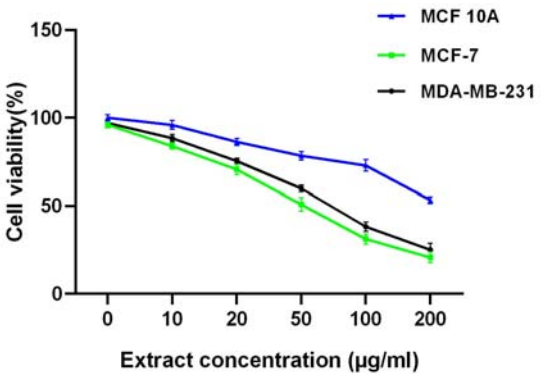
برای تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثرات سمیت سلولی از نرم‌افزار SAS استفاده شد. اعداد سیکل آستانه مربوط به واکنش qRT – PCR از نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR استخراج و پس از محاسبه پارامترهای مربوطه، آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگینها از آزمون LSD استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

بررسی سمیت سلولی عصاره آبی گیاه شیرین‌بیان: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره درصد زنده ماندن سلولها به طور معنی داری کاهش می‌یابد و این کاهش در رده‌های سرطانی بیشتر از رده نرمال است. در مقایسه بین دو رده سرطانی، رده MCF-7 تحت تأثیر بیشتری قرار گرفته است و درصد زنده‌مانی این رده سلولی در همه

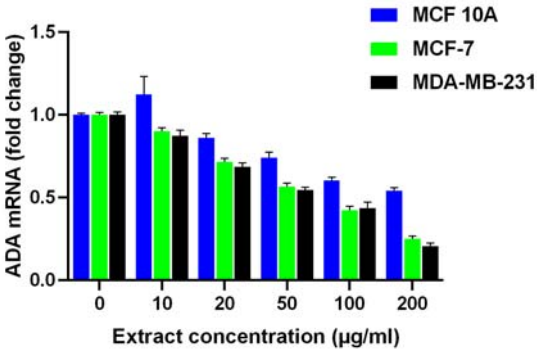
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

غلظتها کمتر از رده دیگر است (شکل ۱). مقدار IC_{50} عصاره این گیاه برای رده MCF-7 معادل ۴۹/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای رده MBA-MD-231 معادل ۶۶/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.



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.

میزان بیان نسبی ژن *ADA* تحت تأثیر عصاره آبی گیاه شیرین‌بیان: مقایسه میانگین تغییرات بیان ژن *ADA* در سه رده سلولی تیمار شده با غلظتهای مختلف عصاره گیاه شیرین‌بیان نشانگر کاهش بیان ژن با افزایش غلظت عصاره‌ها نسبت به شاهد است. همچنین در هر یک از غلظتهای عصاره گیاه شیرین‌بیان کمترین کاهش بیان ژن مربوط به رده نرمال و بیشترین کاهش مربوط به رده MDA-MB-231 است. به جز غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سایر غلظتها تفاوت معنی داری بین دو رده MDA-MB-231 و MCF-7 وجود ندارد. بیشترین کاهش بیان ژن *ADA* تحت تأثیر غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر عصاره گیاه شیرین بیان در رده سلولی MDA-MB-231 به میزان ۴/۸ برابر رخ داده است (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه تغییرات بیان ژن *ADA* در سه رده سلولی تیمار شده با غلظتهای مختلف عصاره گیاه شیرین‌بیان. داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار در هر غلظت به همراه انحراف معیار می‌باشد.

بحث

نتایج حاکی از آن است که عصاره گیاه شیرین‌بیان بر رده-های سرطانی و غیرسرطانی در محدوده غلظتی به کار رفته دارای اثر سمیت سلولی است، منتهی میزان سمیت سلولی آن بر سلولهای سرطانی MCF-7 از همه بیشتر و بر سلولهای غیرسرطانی MCF-10A از همه کمتر بود. مشخص شد که پس از قرارگیری سلولهای سرطانی و غیرسرطانی در مجاورت عصاره یک رابطه خطی نزولی میان غلظت عصاره با درصد زنده ماندن سلولها ایجاد می‌شود. البته در سلولهای سرطانی یک کاهش قابل توجه در درصد زنده ماندن سلولها از غلظت ۵۰ به ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در رده نرمال از غلظت ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده می‌شود. این نتیجه را شاید بتوان به این دلیل دانست که غلظتهای خیلی کم عصاره آن قدر کافی نیست که بتواند با اثر بر تعداد قابل ملاحظه‌ای سلول باعث مرگ و میر فراوانی در آنها شود.

شیرین‌بیان گیاه کاملاً شناخته شده‌ای است که در صنایع غذایی به عنوان شیرین‌کننده و ادویه کاربرد داشته و در صنایع دارویی نیز استفاده‌های متعدد دارد. از این گیاه یک گلیکوزید تری‌ترپن به نام گلیسریزین به دست می‌آید که شیرین بوده و در بعضی کشورها مانند ژاپن جایگزین قند

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

استفاده می‌شود. اما گروه دیگری از ترکیبات که در ریشه این گیاه حضور دارند، ترکیبات فنلی ـ فلاونوئیدی هستند که مطالعات متعددی در زمینه خواص ضدالتهابی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و ضدسرطانی آنها انجام شده است (۹ و ۲۲)، که می‌توان به مطالعه Zheng و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد که تأثیر فلاونوئید ایزولیکوریتیژنین (ISL) را بر سلولهای سرطانی پستان رده MDA-MB-231 مطالعه کردند و نتایج مشخص کرد این ترکیب با کاهش بیان ژنهای COX-2 و CYP4A سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۳) و همچنین در پژوهشی دیگر اثر فلاونوئید Glabridin بر سلولهای رده MDA-MB-231 مطالعه شد و مشخص گردید که تا غلظت ۱۰ میکرومولار این ترکیب اثر سمی بر سلولهای سرطانی ندارد اما بر روند جابه‌جایی و تهاجم این سلولها تأثیر گذار است (۸). به علاوه در مطالعه‌ای اثر سمیت سلولی عصاره این گیاه بر رده سرطانی پستان T47D بررسی و IC50 معادل ۰/۷۵ میلی گرم در میلی لیتر گزارش شد (۱۶). بنابر نتایج این پژوهش و مطالعات ذکر شده در بالا می‌توان چنین استنباط کرد که ریشه گیاه شیرین‌بیان پتانسیل استفاده در تولید داروهای ضدسرطانی را دارا بوده و البته شناسایی ترکیبات مؤثر عصاره این گیاه و تعیین غلظت مناسب این ترکیبات جهت خاصیت ضد سرطانی در مطالعات تکمیلی ضروری می‌باشد.

آدنوزین دآمیناز آنزیمی است که دآمینه شدن هیدرولیتیک آدنوزین به اینوزین را کاتالیز می‌کند. آدنوزین مولکول سیگنال مهمی است که در واکنشهای ضدالتهابی در بافتهای سرطانی و مهار رشد سلولهای سرطانی نقش دارد. گزارشاتی مبنی بر افزایش فعالیت این آنزیم در بافت سرطانی پستان وجود دارد (۲)؛ بنابراین مهار فعالیت این آنزیم یا کاهش سطح بیان ژن آن یکی از اهداف مطالعات ضدسرطان می‌تواند باشد. به این منظور مطالعات متعددی با استفاده از ترکیبات یا عصاره‌های گیاهی انجام شده است از جمله Erguder و همکاران (۲۰۰۸) عصاره آبی چای سبز را بر فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز در بافتهای سرطانی و غیرسرطانی روده بزرگ و معده بررسی کردند و نتایج حاکی از کاهش فعالیت این آنزیم در بافتهای سرطانی بود (۶). به علاوه در مطالعه‌ای دیگر اثر عصاره انگور سیاه بر بافت سرطانی و نرمال روده بزرگ مطالعه شد و نتایج بیانگر کاهش فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز در بافتهای سرطانی نسبت به بافت نرمال بود (۵) و در تحقیقی دیگر بافتهای نمونه برداری شده از افراد مبتلا به سرطان معده و روده بزرگ تحت تأثیر غلظتهای مختلف عصاره آبی گیاهان سویا، دارواش و شبدر به مدت یک ساعت قرار گرفتند. نتایج سنجش فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز حاکی از کاهش معنی دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با نمونه-های تیمار نشده بود (۱۵) و همچنین در پژوهشی متفاوت، افزودن عصاره میوه توتهای مختلف به مدت یک هفته به رژیم غذایی موشهای مبتلا به سرطان روده بزرگ منجر به کاهش تعداد و اندازه تومورها شد. همچنین اندازه‌گیری بیان ژنهای درگیر در ایجاد سرطان روده بزرگ از جمله ژن *ADA* نشان از کاهش بیان آنها داشت (۱۴).

با توجه به سوابق مطالعاتی و اهمیت شناخت مکانیسمهای ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی در پژوهش حاضر اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر بیان ژن *ADA* در رده‌های سلولی سرطان پستان بررسی شد. عصاره این گیاه به ویژه در محدوده غلظتی IC_{50} میزان بیان این ژن را در دو رده سرطانی (MCF-7 و MDA-MB-231) نسبت به رده غیرسرطانی (MCF-10A) کاهش داد. در توجیه اثرات عصاره‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم آدنوزین دآمیناز که موضوع پژوهشهای متعددی بوده است و اینجا نیز به مواردی از آنها اشاره شد، اطلاعات کافی در دسترس نبوده و بسیاری از محققین تنها به گزارش نتایج اکتفا کرده‌اند؛ لذا مطالعات بیشتر و تمرکز بر روندها و مسیرهای پیام رسانی درون سلولی لازم است. در مورد نتایج این تحقیق و تأثیر عصاره‌ها بر بیان ژن *ADA* نیز اگر چه به مکانیسم شناخته شده‌ای به وضوح نمی‌توان اشاره داشت، اما احتمالاً

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

روند تأثیرگذاری از طریق ترکیبات فعال موجود در عصاره و اثر بر مسیرهای پیام رسانی و نهایتاً بر فاکتورهای رونویسی خواهد بود.

نتیجه گیری

در این تحقیق اثر عصاره گیاه شیرین‌بیان بر درصد زنده‌ماندن سلولی و بیان ژن *ADA* درگیر در سرطان در دو رده سلولی سرطانی و یک رده نرمال بررسی شد. نتایج بیانگر اثر سمیت سلولی عصاره این گیاه بر سلولهای سرطانی بود. همچنین بیان ژن *ADA* در سلولهای سرطانی تحت تیمار عصاره کاهش یافت. اگر چه در مطالعات مختلف دلایل زیادی همچون مهار چرخه سلولی، وقوع آپاپتوز و.... را برای توجیه اثر سمیت سلولی عصاره‌ها یا ترکیبات گیاهی ذکر کرده‌اند اما در تحقیق حاضر به دلیل همبستگی مثبت و معنی دار بین درصد زنده ماندن سلولها و بیان ژن *ADA* می‌توان احتمال داد که عصاره این گیاه با کاهش بیان این ژن که نقش اساسی در شکل گیری سرطان و تداوم آن دارد، سبب سمیت سلولی می‌گردد.

منابع

1- Afshar AS, Nematpour FS, Meshkani M, Khafi A. 2017. Growth inhibition of human breast cancer cells and down-regulation of ODC1 and ADA genes by Nepeta binaloudensis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27:84-90

2- Aghaei M, Karami-Tehrani F, Salami S, Atri M. 2005. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clinical biochemistry* 38:887-91

3- Borzenko B. 1991. Use of the study of DNA metabolism enzyme activities as a test system in the treatment of breast cancer. *Sovetskaia meditsina*:14-7

4- Borzenko B, Gorbachev A, Dumanskiĭ I, Shevchenko V, Shepliakov M. 1990. Activity of the enzymes of DNA metabolism in the blood of patients with breast cancer. *Voprosy onkologii* 36:17-23

5- Durak İ, Çetin R, Devrim E, Ergüder İB. 2005. Effects of black grape extract on activities of DNA turn-over enzymes in cancerous and non cancerous human colon tissues. *Life sciences* 76:2995-3000

6- Erguder IB, Namuslu M, Sozener U, Devrím E , Avci A, et al. 2008. Effects of Aqueous Green Tea Extract on Activities of DNA Turn-over Enzymes in Cancerous and Noncancerous Human Gastric and Colon Tissues. *Alternative therapies in health and medicine* 14:30-5

7- Ghayedi N, Bahaoddini A, Khoshnam SE, Gholampour F, Khosravi AR, Moein MR. 2016. Evaluation the effect of hydro-alcoholic extract of GlycyrrhizaGlabra rhizome on the isolated colon contractions of male rats. *SSU_Journals* 24:576-86

8- Hsu YL, Wu LY, Hou MF, Tsai EM, Lee JN, et al. 2011. 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* 55:318-27

9- Kinghorn AD, Chai H-b, Sung CK, Keller WJ. 2011. The classical drug discovery approach to defining bioactive constituents of botanicals. *Fitoterapia* 82:71-9

10- Kojima R, Okada E, Ukawa S, Mori M, Wakai K, et al. 2017. Dietary patterns and breast cancer risk in a prospective Japanese study. *Breast cancer* 24:152-60

11- Lorusso V, Marech I. 2013. Novel plant-derived target drugs: a step forward from licorice? : Taylor & Francis

12- Motie MR, Besharat S, Torkjazi R, Shojaa M, Besharat M, et al. 2011. Modifiable risk of breast cancer in northeast iran: hope for the future. a case-control study. *Breast Care* 6:453-6

13- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, et al. 2007. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *The breast journal* 13:383-91

14- Mutanen M, Pajari A-M, Päivärinta E, Misikangas M, Rajakangas J, et al. 2008. Berries as chemopreventive dietary constituents-a mechanistic approach with the ApcMin/+ mouse. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 17:123-5

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.12.1

15- Namuslu M, Kocaoglu H, Celik H, Avci A, Devrim E, et al. 2014. Effects of aqueous soybean, mistletoe and red clover extracts on activities of adenosine deaminase and xanthine oxidase enzyme. *Bratislavske lekarske listy* 115:367-71

16- Sadat Shandiz S, Salehzadeh A, Ahmadzadeh M, Khalatbari K. 2017. Evaluation of Cytotoxicity Activity and NM23 Gene Expression in T47D Breast Cancer Cell Line Treated with *Glycyrrhiza glabra* Extract. *Journal of Genetic Resources* 3(1):47-53.

17- Shatova O, Borzenko B, Zinkovich I, Sedakov I. 2009. Lactate dehydrogenase, adenosine deaminase and thymidine phosphorylase activity of blood and tissues in breast cancer. *Ukrains' kyi biokhimichnyi zhurnal (1999)* 81:88-93

18- Song NR, Lee E, Byun S, Kim J-E, Mottamal M, et al. 2013. Isoangustone A, a novel licorice compound, inhibits cell proliferation by targeting PI3K, MKK4, and MKK7 in human melanoma. *Cancer Prevention Research* 6:1293-303

19- Tehranian N, Shobeiri F, Pour FH, Hagizadeh E. 2010. Risk factors for breast cancer in Iranian women aged less than 40 years. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 11:1723-5

20- Wang ZY, Nixon DW. 2001. Licorice and cancer. *Nutrition and cancer* 39:1-11

21- Zhang Q, Ye M. 2009. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) . *Journal of Chromatography A* 1216:1954-69

22- Tafrihi M, Nakhaei Sistani R. 2017. E-cadherin/β-catenin Complex; A Target for Anti-cancer and Anti-metastasis Plants/Plant-derived Compounds. *Nutrition and Cancer: An International Journal* 69(5):702-722. doi: 10.1080/01635581.2017.1320415

23- Zheng H, Li Y, Wang Y, Zhao H, Zhang J, et al. 2014. Downregulation of COX-2 and CYP 4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through preventing anoikis resistance, migration and invasion. *Toxicology and applied pharmacology* 280:10-20

Adenosine deaminase (*ADA*) gene expression changes in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and normal cell line MCF-10A treated by *Glycyrrhiza glabra* extract

Safipour Afshar A., Saeid Nematpour F. and Shirzad A.

Dept. of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran.

Abstract

The adenosine deaminase enzyme participates in the metabolism of purines, and plays an essential role in the proliferation and maturation of mammalian cells and, also its activity increases in breast cancer cells. In this study, the effect of aqueous extract of *Glycyrrhiza glabra* on viability and *ADA* gene expression in two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and one normal cell line (MCF-10A) were studied. Cytotoxicity of the *G. glabra* extract was examined by MTT assay. The expression *ADA* gene was evaluated by Real-time PCR. The vitality of cancerous cells are decreased by increasing the concentration of the extract significantly. The expression of *ADA* gene at the concentration of 200 µg/ml of extract in MCF-7 and MDA-MB-231 lines decreased by 4 and 4.8 fold, respectively. The decrease in viability of breast cancer cells observed in this study could be the result of the reduction of *ADA* gene expression.

Key word: Breast cancer, *Glycyrrhiza glabra*, Adenosine deaminase, cell culture.