مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طب مکمل، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳

مقایسه اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه

شوکت مجیدیان عیدگاهی[۱]، جواد بهارآرا[۲*]، سعیده ظفر بالانژاد[۱]

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، ایران.
۲. دکتری زیست شناسی، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، ایران.

تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

چکیده

مقدمه: آنژیوژنز، فرآیند مهمی در وقایع فیزیولوژیک و شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومور و متاستاز است؛ بنابراین هر ترکیبی که منجر به مهار رگ زایی شود، ممکن است به‌عنوان داروی ضد سرطان تکوین یابد. لذا در پژوهش حاضر اثر ضد رگ زایی عصاره شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید در پرده کوریوآلانتوئیک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، ۴۵ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد رأس به‌طور تصادفی در سه گروه شاهد، تجربی یک و دو تقسیم شدند. در روز هشتم، پرده کوریوآلانتوئیک گروه شاهد با دایمتیل سولفوکساید، گروه تجربی یک با عصاره ریشه شیرین‌بیان و گروه تجربی دو با گلیسیریزیک اسید آغشته شد. روز دوازدهم از نمونه‌ها به کمک فتواسترئومیکروسکوپ عکس تهیه و تعداد و طول عروق اندازه‌گیری شد و نیز آزمون درابکین برای تخمین تراکم عروق انجام پذیرفت. داده‌ها به کمک آزمون تی مستقل، در سطح معناداری ($P<۰/۰۵$) تحلیل شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه تیمار با عصاره تام نسبت به شاهد کاهش معناداری نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه تیمار با گلیسیریزیک اسید نسبت به شاهد کاهش معناداری نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین مقایسه این متغیرها با یکدیگر در گروه تیمار با عصاره تام و تیمار با گلیسیریزیک اسید کاهش معناداری نشان داد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره تام ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید هر دو دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه هستند، لیکن اثر مهاری عصاره تام قوی‌تر است. لذا این ترکیبات را می‌توان به‌عنوان کاندید مناسبی در مطالعات آنژیوژنز و بیماری‌های مرتبط با آن پیشنهاد کرد.

کلیدواژه‌ها: رگ زایی، شیرین‌بیان، گلیسیریزیک اسید، پرده کوریوآلانتوئیک جوجه.

*نویسنده مسئول: E.mail: baharara@Yahoo.Com

مقدمه

آنژیوژنز یا فرآیند رشد مویرگ‌های جدید از عروق خونی موجود به سبب نقش دو جانبه در سلامتی و بیماری پدیده‌ای جالب و مورد توجه است (۱). این فرآیند منجر به تکوین عروق و تمایز اندام‌ها در طول دوره جنینی شده و در دوران بزرگ‌سالی در ترمیم زخم، کم‌خونی، عملکرد تخمدان، تکثیر آندومتر رحم در طول چرخه تولید مثلی و تشکیل جفت نقش دارد (۲). در بسیاری از حالات وخیم بیماری‌ها، کنترل رگ زایی دچار اختلال می‌شود، در بیماری‌هایی از قبیل سرطان، دژنره‌شدن وابسته به سن خال‌ها، پسوریازیس و اندومتریوزیس، هنگامی‌که سلول‌های بیمار به‌طور غیرطبیعی مقادیر زیادی فاکتورهای رگ زایی مثل فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال(VEGF) [1]، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF-2) [2] و فاکتور رشد هپاتوسیت تولید می‌کنند، این فاکتورها بر اثرات مهارکننده‌های طبیعی رگ زایی مثل آنژیواستاتین، اندوستاتین و ترومبوسپوندین فائق آمده و در نتیجه رگ زایی بیش از اندازه رخ می‌دهد (۳، ۴). در سال ۱۹۷۱ فُلکمن و همکاران پیشنهاد کردند که رشد تومور و متاستاز آن‌ها وابسته به آنژیوژنز و توقف رگ زایی استراتژی ماندگاری برای توقف رشد تومورها است. وی همچنین پیشنهاد کرد در غیاب فاکتورهای رگ زایی تومور، رشد تومور وابسته به انتشار مواد غذایی از فضای خارج رگی بوده و قطر آن‌ها بیش از ۳ تا ۴ میلی‌متر افزایش نمی‌یابد (۵). همچنین، امروزه اعتقاد بر این است که هم تومورهای سفت (سرطان مثانه، مغز، سینه، رحم، کولون، ریه و پروستات) و هم تومورهای نرم (لوسمی حاد میلوبید و میلوما) دارای پتانسیل رگ زایی بوده و برای رشد، تهاجم و متاستاز خود وابسته به رگ زایی هستند (۶). در عین حال افزایش مقاومت سرطان‌ها به درمان‌های رایج، امروزه تبدیل به مسئله دردسرسازی شده چنانچه تلاش برای کشف و شناسایی عوامل ضد سرطانی جدید که موجب افزایش میزان حساسیت سلول‌های سرطانی شوند رو به افزایش نهاده است؛ بنابراین، تحقیق و توسعه داروهای مؤثرتر یا با اثرات جانبی کم‌تر بر آنژیوژنز تومور اهمیت فزاینده‌ای دارد (۷). در این راستا گیاهان از جمله کاندیدهای مناسب برای ساخت داروهای مؤثر بر رگ زایی بوده و همواره به‌عنوان منابع مهمی برای ایجاد و توسعه فاکتورهای بالقوه جدید برای محققان محسوب می‌شوند، در حقیقت، گیاهان مخلوط‌های شیمیایی پیچیده با خواص دارویی هستند که داروسازی امروزی نمی‌تواند آن را تولید کند (۶). از جمله گیاهان دارویی که مورد استفاده طولانی در اروپا و آسیا داشته و مطالعات تجربی و بالینی اثرات درمانی بخش‌های مختلف و ترکیبات مؤثره متنوع آن را در درمان بیماری‌های مختلف از جمله اختلالات التهابی، ویروسی و باکتریایی، انگلی، سیستم عصبی مرکزی، قلبی–عروقی، ایمنولوژیک، کلیوی، معدی–روده‌ای، کبدی، پوستی، تنفسی و سرطانی نشان داده‌اند، گیاه شیرین‌بیان با نام علمی Glycyrrhiza glabra L است (۸). شیرین‌بیان گیاهی چندساله از طایفه Astragaleae و تیره Fabaceae است که شامل ریشه خشک شده با پوست و شاخه‌های پایه این درخت است. نام انگلیسی آن Liquorice و Licorice و نام عربی آن شجره‌السوس و عرق سوس بوده و به‌واسطه وجود ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزومش در دنیا اهمیت دارد، شیرین‌بیان دارای واریته‌های متفاوتی است که مهم‌ترین واریته‌های آن شامل تیپیکال۳ (شیرین‌بیان ایتالیا–اسپانیایی)، گلاندولیفرا۴ (شیرین‌بیان روسی) و ویولاسه۵ (شیرین‌بیان فارسی) است (۱۰–۸). در بررسی‌های درون‌تنی و برون‌تنی عصاره آبی شیرین‌بیان رگ زایی‌های جدید را مهار می‌کند (۱۱) و دارای پتانسیل ضد توموری است (۱۲). گلیسریزیک اسید[6] یا گلیسریزین[7] نیز که شناخته‌شده‌ترین ترکیب شیرین‌بیان است، طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژی دارد (۱۳). بر اساس

[1]. Vascular Endothlial Growth Factor
[2]. Fibriblast Growth Factor
[3]. *Typical*
[4]. Glandoulifera
[5]. Violacea
[6]. Glycyrrhizic acid
[7]. Glycyrrhizin

گزارش‌های فراوان، این ترکیب خصوصیات ضدالتهابی، ضدویروسی، محافظ عصبی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و افزاینده ایمنی (۱۴) داشته و دارای توان محافظتی شیمیایی بالایی در برابر تومور زایی روده بزرگ است (۱۵). همچنین به خاطر اثرات آپوپتوزی روی سلول‌های توموری داروی قابل توجهی برای درمان سرطان به نظر می‌رسد (۱۶). لذا در پژوهش حاضر اثر عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان در مقایسه با ماده مؤثره‌اش (گلیسیریزیک اسید) بر فرآیند آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی است و در آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۲ نجام شد. در میان روش‌های مطالعه آنژیوژنز روش بررسی پرده کوریوآلانتوئیک[1](CAM) به‌عنوان یک مدل بسیار مناسب درون‌تنی، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). برای انجام آزمایش‌ها از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد رأس تهیه شده از مجتمع تولیدی مرغ فریمان به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. از آنجا که پرده کوریوآلانتوئیک از روز پنجم انکوباسیون شروع به تشکیل و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم‌مرغ را اشغال می‌کند و همچنین در این روز قلب کاملاً تشکیل و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق می‌افتد، لذا بررسی شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون مورد توجه قرار گرفت و روز دوازدهم برای عکس‌برداری و اندازه‌گیری عروق انتخاب شد (۱۷). تعداد ۴۵ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار در سه گروه آزمایشی به‌صورت تصادفی و مساوی توزیع شدند. این گروه‌ها عبارت بودند از شاهد که در حضور حلال دایمتیل سولفوکساید[2] مِرک[3] نگه‌داری شد، گروه تجربی یک که با عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان در غلظت ۶۰g/mlμ (۱۱) و گروه تجربی دو که با محلول گلیسیریزیک اسید در غلظت ۱mg/ml (۱۴) تیمار شد.

روش آماده‌سازی عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان: ۲۰ گرم پودر تجاری ریشه شیرین‌بیان تهیه شده از شرکت شیرین داروی شیراز به کمک دستگاه سوکسله و با بخارآب جوش عصاره‌گیری شد. سپس عصاره استحصالی برای تغلیظ داخل انکوباتور قرار داده شد تا آب مقطر اضافی حذف و در نهایت زیر هود بعد از ۲۴ ساعت کاملاً خشک شد. ۰/۰۱۲ گرم از عصاره خشک با ۱۰ سی‌سی دایمتیل سولفوکساید استریل مخلوط گشت تا محلول استوک شیرین‌بیان به دست آید، سپس این محلول فیلتر و غلظت ۶۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر از آن ساخته و برای تیمار مورد استفاده قرار گرفت (۱۸، ۱۱).

روش تهیه محلول گلیسیریزیک اسید: در این پژوهش از پودر گلیسیریزیک اسید با وزن مولکولی ۸۲۲/۹ و فرمول شیمیایی$C4_2H_{62}O_{16}$ که به‌صورت آماده خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ[4] آمریکا استفاده شد. غلظت مورد نیاز این ترکیب برای این تحقیق ۱mg/ml در نظر گرفته شد که برای تهیه آن ۰/۰۱ گرم از پودر گلیسیریزیک اسید در ۱۰ CC دایمتیل سولفوکساید حل شد (۱۸، ۱۴).

تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار درون دستگاه جوجه‌کشی تحقیقاتی (R.com) ساخت کره جنوبی با وضعیت چرخش اتوماتیک در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۷ درصد قرار داده شدند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده با کمک هود لامینار (Telstar AV-100) ساخت اسپانیا، بخشی از پوسته تخم‌مرغ‌ها برداشته و به‌وسیله لامل و پارافین استریل آرمان سینا تولید ایران، پنجره‌ای در یک طرف تخم‌مرغ‌ها ایجاد شد. سپس تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شد و چرخش دستی دو بار در روز برای تکوین طبیعی جنین انجام گرفت. در روز هشتم انکوباسیون پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شده و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ژلاتینی (مرکب از آلبومین سفیده تخم‌مرغ و محلول آگار در نرمال سالین با نسبت مساوی به همراه ۲۰۰ مایکرولیتر پنی‌سیلین استرپتومایسین که به‌صورت تازه در شرایط استریل تهیه

[1]. Chorioalantoic Membrane
[2]. Dimethyle Sulfoxid - DMSO
[3]. Merck
[4]. Sigma Alderich

شده) به ابعاد ۴×۴×۱ میلی‌متر قرار داده و در نمونه‌های هر گروه مقدار ۱۰ مایکرولیتر از ترکیبات مذکور به اسفنج اضافه شد. سپس محل پنجره مجدداً پوشانیده و تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون در تمام نمونه‌ها از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess) ساخت آلمان تصاویری با درشت‌نمایی معین تهیه شد. تصاویر به کمک نرم‌افزار Image J بررسی و اندازه‌گیری شاخص‌های تعداد و طول انشعابات عروقی در سطح مقطع یکسان (مربع‌هایی به ابعاد ۲/۵×۲/۵ سانتی‌متر مربع در چهار طرف اضلاع اسفنج ژلاتینی) صورت گرفت (شکل ۱). همچنین سطح هموگلوبین در پرده کوریوآلانتوئیک با استفاده از معرف درابکین، تولید شرکت زیست‌شیمی ایران به‌عنوان معیاری برای تخمین تراکم عروق سنجیده شد، به این ترتیب که عروق تازه شکل گرفته پرده کوریوآلانتوئیک همگن شده و مقدار ۲۴ مایکرولیتر از این مخلوط همگن با ۳ میلی‌لیتر محلول درابکین مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه باقی ماندن در دمای محیط سانتریفیوژ شد. سپس میزان جذب مایع شفاف رویی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۴۶ نانومتر ثبت شد (۲۰ و ۱۹). داده‌های کمّی حاصل به کمک نرم‌افزار آماری SPSSنسخه ۱۶، با آزمون تی مستقل در سطح معنادار (P<۰/۰۵) تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌ها

با توجه به استقلال گروه‌ها میانگین داده‌های هر گروه با گروه شاهد به کمک آزمون تی مستقل مقایسه شد و نتایج ذیل به دست آمد. میانگین تعداد (۳/۳۵±۲۰/۰۴) و طول (۶/۳۹mm±۴۹/۴۱) انشعابات عروقی و غلظت هموگلوبین (۱/۲۵±۱/۲۹gr/dl) در گروه تجربی یک نسبت به میانگین تعداد (۴/۷۶±۲۹/۱۱) و طول (۶/۴۶mm±۶۱/۷۹) انشعابات عروقی و غلظت هموگلوبین (۱/۵۵gr/dl±۳/۳۴) گروه شاهد کاهش معنادار نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین کاهش معنادار میانگین تعداد (۳/۴۹±۲۳/۹۶) و طول (۵/۸۵mm±۵۴/۵۳) انشعابات عروقی گروه تجربی دو نسبت به شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه تجربی یک نسبت به میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه تجربی دو نیز کاهش معنادار نشان داد (P<۰/۰۵) (نمودارهای ۲ و ۱) (جدول ۱).

محل قرارگیری اسفنج روی تصاویر مشخص شده، مربع‌های اطراف اسفنج محل شمارش را نشان می‌دهند. A: نمونه شاهد (نگهداری در شرایط طبیعی و همراه با DMSO)؛ B: نمونه تجربی یک (تیمار با عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان در غلظت ۶۰g/mlμ)؛ C: نمونه تجربی دو (تیمار با گلیسیریزیک اسید در غلظت ۱mg/ml).

بحث

طی دهه‌های اخیر و به دنبال شناسایی فرایند رگ زایی و نقش مسلم این پدیده در بروز و گسترش بیماری‌های مزمن مختلف از جمله بیماری سرطان، محققان را برای یافتن ترکیبات مختلف مشتق از منابع طبیعی با اثرات مهار رگ زایی به تکاپو واداشت و مطالعه بر روی گیاهان با هدف شناسایی و کشف ترکیبات ضد رگ زایی برای ساخت داروها، به علت عوارض جانبی کمتر در درمان بیماری‌های مرتبط با رگ زایی اهمیت فراوانی یافته است (۶).

در پژوهش حاضر گیاه دارویی شیرین‌بیان که به‌طور معمول دارای طیف وسیعی از اثرات درمانی است و خواص ضد سرطانی آن سال‌ها است شناخته شده و خواص پیش‌گیری کننده از سرطان آن توسط موسسه ملی سرطان معرفی شده است (۸). در مقایسه با یکی از ترکیبات مؤثره‌اش به نام گلیسیریزیک اسید بر روند آنژیوژنز برای تعدیل و کاهش رگ زایی برای مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق حاکی از اثر مهاری هر دو ترکیب یعنی عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید بر آنژیوژنز است، زیرا تعداد و طول انشعابات عروقی پرده کوریوآلانتوئیک در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد در محل تیمار به‌طور معناداری کاهش نشان داد، ولی مقایسه اثرات مهاری عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید، نشان‌دهنده اثر مهاری قوی‌تر عصاره تام نسبت به ماده مؤثره‌اش بود که دلیل آن را می‌توان مربوط به فعالیت سینرژیک سایر ترکیبات موجود

در عصاره تام در مقایسه با گلیسیریزیک اسید به‌تنهایی دانست (۲۱، ۲۲، ۲۳).

همچنین مقایسه یافته‌های این پژوهش با تحقیقات مشابه حکایت از همسویی نتایج دارند، چنانچه در بررسی‌های به عمل آمده درون‌تنی و برون‌تنی، شیلا و همکاران مشخص شد، عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان تکثیر سلول‌های توموری (EATCs) [1] و آنژیوژنز را کاهش می‌دهد و دارای پتانسیل آنتی توموری و آنتی آنژیوژنزی است که دلیل این مهار در ارتباط با کاهش فاکتور آنژیوژنیک (VEGF) بیان شد (۱۱). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۲ توسط شیلا و همکاران به سرپرستی ساچین صورت گرفت، مکانیسم ضد رگ زایی شیرین‌بیان در ارتباط با پروتئین مرتبط با متاستاز (MTA1) [2] معرفی شد (۱۲). از سویی دیگر اثرات ضد رگ زایی گلیسیریزیک اسید به استناد مطالعه کیم و همکاران که نشان دادند، فعالیت‌های ضد رگ زایی گلیسیریک اسید در ارتباط با مهار مسیر سیگنالینگ ROS-ERK و از وقایع سلولی مهم برای القاءآنژیوژنز است (۱۴). همچنین گلیسیریزین نوعی مهارکننده پروتئین (HMGB1) [3] تشخیص داده شده است که در درمان‌های ضد سرطانی و ضد رگ زایی کاربرد دارد (۲۴). مطالعات دیگری نیز یافته‌های ما را تأیید می‌کند از آن جمله تحقیق کانگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ و جانجی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مبنی بر اثرات ضد توموری و خواص آنتی آنژیوژنیک ریشه شیرین‌بیان و ایزولیکوریتیجنین[4] که یکی از ترکیبات مؤثره این گیاه است و از طریق مهار ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) [5] و سرکوب (VEGF) رگ زایی را مهار می‌کند (۲۲ و ۲۱). لیکوچالکون-اِی[6] نیز نوعی ترکیب فنولیک اصلی شیرین‌بیان است به‌طور قابل توجهی تکثیر، مهاجرت و توبولیزاسیون سلول‌های اندوتلیالی سیاهرگ بند ناف انسان (HUVECs) [7] را مهار کرده و رشد مویرگ‌ها در حلقه آئورتیک موش صحرایی را کاهش می‌دهد (۲۳). در تحقیق دیگری نیز معلوم شد، شیرین‌بیان و یکی از متابولیت‌های فعال آن به نام لیکوچالکون-اِی با القاء اتوفاژی علاوه بر آپوپتوز، از طریق سرکوب بیان Bcl-2 و مسیر (mTOR) [8] در رده سلول‌های سرطان پروستات LNCaP منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۵).

در مجموع این مطالعه نشان داد که عصاره ریشه شیرین‌بیان به میزان بیشتر و گلیسیریزیک اسید به میزان کمتر قادر به مهار رگ زایی هستند.

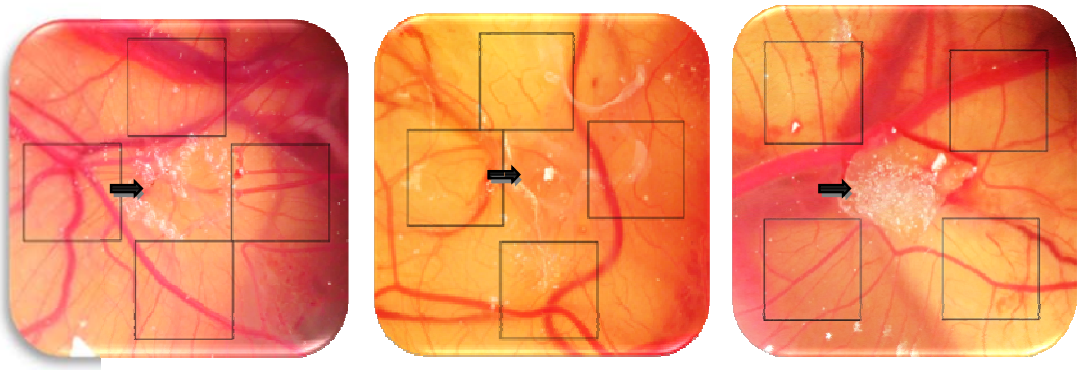
نتیجه‌گیری

نتیجه این پژوهش بیانگر آن است که عصاره تام آبی ریشه شیرین‌بیان و ترکیب فعال آن به نام گلیسیریزیک اسید دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه هستند و تشکیل رگ‌های خونی را به‌طور موضعی در محل تیمار کاهش می‌دهند. همچنین اثر مهاری عصاره تام ریشه شیرین‌بیان نسبت به گلیسیریزیک اسید شدیدتر است. لذا این گیاه و ترکیبات مؤثره‌اش می‌تواند برای تحقیقات بیشتر به‌عنوان کاندید مناسبی برای مطالعات درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

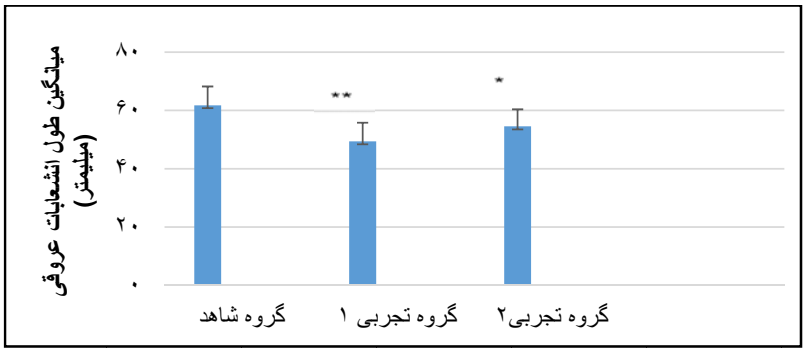
از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری که در انجام این تحقیق همکاری داشتند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

1. Ehrlich Ascites Tumor Cells
2. Metastasis Associated protein
3. High Mobility Group Box1
4. Isoliquiritgenin
5. Matrix Metallo Proteinases
6. Licochalcon-A
7. Human Umbilical Vein Endothelial Cells
8. Mammalian Target of Rapamaycin



شکل ۱. تصویر فتواسترئومیکروسکوپ از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار (درشت‌نمایی ۸۰X)

نمودار ۱. میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه‌های شاهد؛ تجربی ۱: تحت تیمار با عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان در غلظت ۶۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر و تجربی ۲: تحت تیمار با گلیسیریزیک اسید در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
P<۰/۰۱** P<۰/۰۵*



نمودار ۲. میانگین طول انشعابات عروق خونی در نمونه‌های شاهد؛ تجربی ۱: تحت تیمار با عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان در غلظت ۶۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر و تجربی ۲: تحت تیمار با گلیسیریزیک اسید در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
P<۰/۰۱** P<۰/۰۵*

جدول ۱. گروه شاهد، تجربی ۱ (تحت تیمار با عصاره آبی ریشه شیرین‌بیان در غلظت ۶۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر) و تجربی ۲ (تحت تیمار با گلیسیریزیک اسید در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

متغیر	تعداد عروق (انحراف معیار±میانگین)	طول عروق (انحراف معیار±میانگین)	غلظت هموگلوبین (انحراف معیار±میانگین)
شاهد	۲۹/۱۱±۴/۷۶	۶۱/۷۹±۶/۴۶mm	۳/۳۴±۱/۵۵gr/dl
تجربی یک	۲۰/۰۴±۳/۳۵**	۴۹/۴۱±۶/۳۹mm**	۱/۲۵±۱/۲۹gr/dl
تجربی دو	۲۳/۹۶±۳/۴۹*	۵۴/۵۳±۵/۸۵mm*	۳/۳۹±۱/۲۸gr/dl

**: معناداری در سطح (P<۰/۰۰۱)

*: معناداری در سطح (P<۰/۰۵)

References:

1. Skalak TC. Angiogenesis and microvascular remodeling: a brief history and future roadmap. Microcirculation. 2005;12(1):47-58.
2. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2010;10(7):505-14.
3. Noonan DM, Benelli R, Albini A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. Recent Results Cancer Res. 2007;174:219-24.
4. Quesada AR, Munoz-Chapuli R, Medina MA. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. Med Res Rev. 2006;26(4):483-530.
5. Hoff PM, Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. Cancer Treat Rev. 2012;38(7):825-33.
6. Mohammadi-Motlagh HR MK, Mostafaie A. Review: Plants as useful agents for angiogenesis and tumor growth prevention. Physio and Pharmaco. Physio and Pharmaco. 2010;14(3):297-312.
7. Kummalue T. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. J Med Assoc Thai. 2005;88(11):1725-34.
8. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytotherapy research: PTR. 2008;22(6):709-24.
9. Nassiri Asl M, Hosseinzadeh H. Review of Antiviral Effects of Glycyrrhiza glabra L. and Its Active Component, Glycyrrhizin. Journal of Medicinal Plants. 2007;2(22):1-12.
10. Khan Ahmady M NAH, Akhundzadeh Sh, Khalighi Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, et al. A Review on medicinal plant of Glycyrrhiza glabra.L. J Med Plants. 2013;2(46):1-12.
11. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by Glycyrrhiza glabra. Int Immunopharmacol. 2006;6(3):494-8.
12. Sachin Raj MN SM, Yashaswini B, Akhilesh K, Bharathi.P S. MTA1 induced angiogenesis, migration and tumor growth is inhibited by Glycyrrihiza glabra. IOSR J Pharmacy (IOSRPHR) 2012; 2(4): 34-43.
13. Hui-yan G, Li-dong G, Jing-hua Y. Measurement and comparison of glycyrrhizic acid contents in root of licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) from different cultivating areas. Journal of Forestry Research. 2002;13(2):141-3.
14. Kim KJ, Choi JS, Kim KW, Jeong JW. The anti-angiogenic activities of glycyrrhizic acid in tumor progression. Phytotherapy Research: PTR. 2013;27(6):841-6.
15. Khan R, Khan AQ, Lateef A, Rehman MU, Tahir M, Ali F, et al. Glycyrrhizic acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of Wistar rats. PloS one. 2013;8(2):e56020.
16. Thirugnanam S, Xu L, Ramaswamy K, Gnanasekar M. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP. Oncology reports. 2008;20(6): 1387-92.
17. Mousavi M, Baharara j, Zafar-Balannezjad s, Nejadsharokhabadi k. The synergic effects of Saffron aqua extract and low frequency

electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences. 2013;15(1):1-10.
18. Dong S, Inoue A, Zhu Y, Tanji M, Kiyama R. Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of Glycyrrhiza glabra root. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2007;45(12): 2470-8.
19. Viji RI, Kumar VB, Kiran MS, Sudhakaran PR. Angiogenic response of endothelial cells to heparin-binding domain of fibronectin. The international journal of biochemistry & cell biology. 2008;40(2):215-26.
20. Araujo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2010; 64(1):29-34.
21. Kang SW, Choi JS, Choi YJ, Bae JY, Li J, Kim DS, et al. Licorice isoliquiritigenin dampens angiogenic activity via inhibition of MAPK-responsive signaling pathways leading to induction of matrix metalloproteinases. The Journal of nutritional biochemistry. 2010;21(1):55-65.
22. Kim YH, Shin EK, Kim DH, Lee HH, Park JH, Kim JK. Antiangiogenic effect of licochalcone A. Biochemical pharmacology. 2010;80(8):1152-9.
23. Jhanji V, Liu H, Law K, Lee VY, Huang SF, Pang CP, et al. Isoliquiritigenin from licorice root suppressed neovascularisation in experimental ocular angiogenesis models. The British journal of ophthalmology.2011;95(9):1309-15.
24. Smolarczyk R, Cichon T, Matuszczak S, Mitrus I, Lesiak M, Kobusinska M, et al. The role of Glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2012;60(5):391-9.
25. Yo YT, Shieh GS, Hsu KF, Wu CL, Shiau AL. Licorice and licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway. Journal of agricultural and food chemistry. 2009;57(18):8266-73.

Original Article

Comparison of anti-angiogenic effect of Licorice root aqueous extract and Glycyrrhizic acid chick Chorioallantoic membrane

Majidian Eidgahi Sh[1], Baharara J[2*], Zafar Balanezhad S[3]

1. MSc, Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. PhD, Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: 24 July, 2014؛ Accepted: 17 February, 2015

Abstract

Background: Angiogenesis, is an important process in physiological and pathological conditions as tumor growth and metastasis. Therefore, combinations that lead to inhibit angiogenesis may develop as an anti-cancer drug. In the present research, the anti-angiogenesis effect of Licorice root extract and Glycyrrhizic acid in Chorioallantoic membrane is investigated.

Methods: In this experimental study, 45 ROSS fertilized eggs were randomly divided into three groups, Control, experimental 1 and 2. On the eighth day, Chorioallantoic membrane was soaked in control group with DMSO, in the first experimental group with extract of licorice and in the second, with Glycyrrhizic acid. Twelfth day photographed from samples whit using of photosteriomicroscope, the number, and length of vessels measured, also Drabkin test was performed to estimate the vessel density. Obtained data were analyzed by t-test ($P<0.05$).

Results: The mean number and length of vessels in samples treated with extract was showed a significant decrease compared to the control ($P <0.001$). The mean number and length of vessels in samples treated with Glycyrrhizic acid was showed a significant reduction compared to the control ($P <0.05$). Compare this parameters, in samples treated with Licorice extract to samples treated with Glycyrrhizic acid was showed a significant decrease ($P <0.05$).

Conclusion: Both of, licorice extract and Glycyrrhizic acid have inhibitory effect on angiogenesis in Chick chorioallantoic membrane; however, the inhibitory effect of extract is stronger than Glycyrrhizic acid. Therefore licorice and Glycyrrhizic acid can be as suitable candidate on angiogenesis study.

Key words: Angiogenesis, Licorice, Glycyrrhizic acid, Chick Chorioallantoic membrane.

*Corresponding author: E.mail: baharara@Yahoo.Com