

بررسی اثر سیتوتوکسیک ۱۰-جینجرول، از مشتقات گیاه دارویی زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe*)، بر رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد

سمیه نجفی درچه^۱، سهیلا رهگذر^{۲*}، داریوش طالعی^۳ و الهه‌السادات قدوسی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
 پست الکترونیک: rahgozar@sci.ui.ac.ir

۳- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

شیمی درمانی به‌عنوان معمول‌ترین روش درمان سرطان دارای عوارض جانبی بسیاری می‌باشد که ادامه روند درمان را دشوار می‌سازد. مطالعات نشان می‌دهد استفاده از گیاهان دارویی به‌صورت منفرد یا در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند سبب کاهش اثرات مخرب ناشی از شیمی‌درمانی شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر ۱۰-جینجرول به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مشتقات گیاه دارویی زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe*) بر رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد بود. رده‌های سلولی لنفوبلاستی حاد (R-CCRF-CEM، CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95) پس از رسم منحنی رشدشان، با غلظت‌های افزایشی ۱۰-جینجرول تیمار شدند. درصد زنده‌مانی با روش آزمون MTT ارزیابی شد. علاوه بر این، جهت بررسی میزان مرگ سلولی و تأیید نتایج حاصل از آزمون MTT، از روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو استفاده شد. به‌منظور کشف فرآیندهای بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی مرتبط با ژن‌های هدف ۱۰-جینجرول، آنالیز تفسیر عملکردی با استفاده از منبع GO و پایگاه داده Enrichr (یک ابزار جامع آنالیز مجموعه ژن) انجام شد. جهت آنالیزهای آماری نیز از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۱۰-جینجرول به‌طور معنی‌دار بر رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 اثر سیتوتوکسیک دارد ($P < 0.05$). این اثر در غلظت‌های بالا، در رده R-CCRF-CEM و Nalm-6 بیشتر از رده CCRF-CEM بود. آنالیزهای GO نیز آپویتوز را به‌عنوان مهمترین فرآیند بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجرول تعیین نمود. در این پژوهش برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک ۱۰-جینجرول بر سلول‌های سرطان خون لنفوبلاستی حاد نشان داده شد.

واژه‌های کلیدی: شیمی‌درمانی، زنجبیل (*Zingiber officinale Rosc.*)، ۱۰-جینجرول، سرطان خون لنفوبلاستی حاد.

مقدمه

سرطان خون لنفوبلاستی حاد (ALL: Acute lymphoblastic leukemia) شایع‌ترین سرطان کودکان است. این سرطان از سلول‌های پیش‌ساز لنفوسیتی B یا T منشأ می‌گیرد و براساس ویژگی‌های ایمونوفنوتیپی به دو نوع اصلی B-ALL و T-ALL تقسیم می‌شود (Pui, 2010).

به‌علت پیشرفت در شیوه‌نامه‌های درمانی، زنده‌مانی ۵ ساله (Five-year survival) در بیماران مبتلا به ALL، از ۴۱٪ در اواسط دهه ۱۹۷۰ تا ۷۰٪ در طول سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۱ افزایش یافته است (Siegel et al., 2016). اگرچه هدف داروهای شیمی‌درمانی از بین بردن سلول‌های توموری است، انواع مختلفی از سلول‌های طبیعی نیز تحت تأثیر این داروها قرار می‌گیرند. از مهم‌ترین عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی می‌توان به خستگی، حالت تهوع، استفراغ، اسهال، درد و عفونت اشاره نمود (Sak, 2012). علاوه بر این، بسیاری از بیماران در طول درمان به داروهای شیمی‌درمانی مقاومت پیدا کرده که خود از مشکلات جدی در درمان به‌شمار می‌آید (Pui et al., 2015). به همین دلیل استفاده از داروهای گیاهی برای مقابله با سلول‌های سرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. داروهای گیاهی با القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، اختلال در مسیرهای پیام‌رسانی سلول، مهار توپوایزومرازها و تداخل با مایکروتوبول‌ها، اثرهای ضدسرطانی خود را اعمال می‌کنند (Safarzadeh et al., 2014).

زنجبیل عضوی از خانواده Zingiberaceae است. به‌طوری که اثرهای ضدسرطانی این گیاه دارویی و مشتقاتش بر انواع مختلفی از سرطان‌ها شامل پروستات، ریه، کلون، پوست، معده، کبد و پستان به اثبات رسیده است (Butt & Sultan, 2011). طبق تحقیق اخیر، اثر ضدسرطانی زنجبیل بر سرطان خون لنفوبلاستی حاد نشان داده شده است. زنجبیل به‌صورت منفرد و یا در ترکیب با

داروی شیمی‌درمانی متوترکسات، سبب اثرهای سیتوتوکسیک در رده‌های سلولی Nalm-6 (از نوع B-ALL)، CCRF-CEM (از نوع T-ALL) و سلول‌های بدخیم کودکان مبتلا به ALL می‌شود (Babasheikhali et al., 2019).

آنالیز شیمیایی زنجبیل بیش از ۴۰۰ ترکیب مختلف را در زنجبیل نشان می‌دهد (Prasad & Tyagi, 2015). جینجرول‌ها و شگول‌ها به ترتیب فراوان‌ترین اجزای فنولی در زنجبیل تازه و خشک شده می‌باشند که دارای اثرهای ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند (Semwal et al., 2015). از بین انواع مختلف شگول و جینجرول، ۶-شگول، ۶، ۸ و ۱۰-جینجرول اصلی‌ترین ترکیبات فعال زنجبیل هستند. مطالعات نشان می‌دهد اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ۱۰-جینجرول از ۶ و ۸-جینجرول بیشتر است (Dugasani et al., 2010). علاوه بر این اثر ضدسرطانی ۱۰-جینجرول بر سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک، سلول‌های سرطانی ریه، تخمدان، ملانوما، کلون و پستان قوی‌تر از سایر جینجرول‌ها می‌باشد (Wei et al., 2005; Kim et al., 2008; Sang et al., 2009; Ryu & Chung, 2015; Bernard et al., 2017). ۱۰-جینجرول از طریق غیرفعال کردن مسیر پیام‌رسانی Akt و p38^{MAPK}، توقف چرخه سلولی در فاز G1، مهار بیان گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و القای آپوپتوز اثرهای ضدتوموری خود را القاء می‌کند (Joo et al., 2016; Fuzer et al., 2017; Zhang et al., 2017). علاوه بر این، ۱۰-جینجرول با مهار ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2: Matrix metalloproteinases-2) مانع از تهاجم سلولی در پاسخ به محرک‌های میتوژنی می‌شود (Joo et al., 2016).

از آنجا که نقش ۱۰-جینجرول بر سرطان خون لنفوبلاستی حاد تاکنون در هیچ تحقیقی اعم از داخل یا خارج کشور مطالعه نشده است، در این پروژه برای اولین بار، اثر سیتوتوکسیک این مشتق دارویی بر رده‌های

$۱۰^۵ \times ۳/۳۳$ ، $۱۰^۵ \times ۱/۳۳$ ، $۱۰^۵ \times ۰/۶۶$ و $۱۰^۵ \times ۰/۳۳$ سلول در هر میلی لیتر و در بازه زمانی ۰ تا ۷۲ ساعت و رده سلولی Nalm-6، تعداد $۱۰^۵ \times ۲/۴$ ، $۱۰^۵ \times ۱/۳۳$ ، $۱۰^۵ \times ۰/۶$ و $۱۰^۵ \times ۰/۳$ سلول در هر میلی لیتر و در بازه زمانی صفر تا ۹۶ ساعت کشت داده شدند. پس از گذشت بازه زمانی مورد نظر میزان زنده‌مانی به روش MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-) (diphenyltetrazolium bromide) اندازه‌گیری شد.

تیمار رده‌های سلولی با غلظت‌های مختلف ۱۰-جینجرول تعداد $۱۰^۵ \times ۱/۳۳$ سلول در هر میلی لیتر از رده‌های سلولی CCRF-CEM، Nalm-6، R-CCRF-CEM و RN95 با غلظت‌های افزایشی ۱۰-جینجرول (Sigma; Munich, Germany) در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت کاشته شدند. حجم نهایی هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر بود. پس از گذشت مدت زمان متناسب با زمان دو برابر شدن رده‌های سلولی، درصد زنده‌مانی به روش آزمون MTT سنجیده شد.

سنجش میزان زنده‌مانی به روش آزمون MTT

به‌طور معمول در مطالعات مربوط به بررسی اثر سمیت دارو، از روش MTT برای تعیین تعداد سلول‌های زنده استفاده می‌شود (Sylvester, 2011؛ Akimoto *et al.*, 2015). برای تهیه محلول MTT (Atocel; Graz, Austria) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی (الیکوت) و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سنجش میزان زنده‌مانی، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و پلیت کشت سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۳ ساعت از زمان انکوباسیون، به‌منظور حل کردن

سلولی B-ALL و T-ALL غیرمقاوم و مقاوم به داروی شیمی‌درمانی بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

رده‌های سلولی CCRF-CEM (رده سلولی T-ALL) و Nalm-6 (رده سلولی B-ALL) از مؤسسه پاستور خریداری شدند. علاوه‌براین، رده‌های سلولی R-CCRF-CEM و RN95 که به ترتیب رده سلولی T-ALL مقاوم به داروی شیمی‌درمانی متوترکسات و رده سلولی B-ALL مقاوم به داروی شیمی‌درمانی سایتارابین می‌باشند، مورد استفاده قرار گرفتند. این دو رده سلولی توسط تیم تحقیقاتی ما در دانشگاه اصفهان ایجاد شده و در سازمان ثبت اسناد و املاک کشور به ترتیب دارای شماره ثبت اختراع ۹۸۸۲۴ و ۱۰۰۲۸۱ هستند.

هر چهار رده در محیط کشت RPMI1640، حاوی ۱۰٪ FBS (Fasting Blood Sugar) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استریتومایسین کشت داده شدند. به محیط کشت رده سلولی Nalm-6، ۱٪ ال‌گلوتامین نیز اضافه شد.

رسم منحنی رشد

به‌منظور یافتن تعداد سلول مناسب برای کشت در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه و همچنین تعیین بازه زمانی مناسب، منحنی رشد برای هر یک از چهار رده سلولی CCRF-CEM، Nalm-6، R-CCRF-CEM و RN95 رسم شد. برای رسم منحنی رشد، پس از سانتی‌فیوژ نمودن سوسپانسیون سلولی، رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS حل شد. سپس حجمی از سوسپانسیون حاوی تعداد سلول مورد نظر محاسبه و در حجم نهایی ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS در بازه‌های زمانی متفاوت کشت داده شد. رده‌های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM و RN95، تعداد

بلورهای بوجود آمده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی خارج و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. سپس با کمک پیتینگ بلورهای ایجاد شده در کف هر چاهک به طور کامل حل گردید و جذب نوری (OD) سلولها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد (Abedi et al., 2020).

بررسی درصد مرگ سلولی

با توجه به شیوع بالای B-ALL در کودکان (Pieters & Carroll, 2008)، رده سلولی Nalm-6 انتخاب شد و مطابق با روش MTT، به مدت ۹۶ ساعت با غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۱۰-جینجروول و یا غلظت ۰/۴٪ از DMSO (به عنوان کنترل) تیمار شد. پس از آن، درصد مرگ سلولی با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو (Sigma, Munich, Germany) سنجیده شد. در این روش پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولی، درصد زنده مانده با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد زنده مانده سلولی} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجروول

به منظور یافتن فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجروول، ژن ها و پروتئین های تحت تأثیر ۱۰-جینجروول از مقالات مختلف استخراج شده و بعد با استفاده از منبع GO (Gene Ontology) و پایگاه داده Enrichr تجزیه و تحلیل شدند. GO منبعی است که ژن ها یا پروتئین ها را مطابق با عملکرد یا مسیرهای مولکولی شان و براساس مقالات منتشر شده، دسته بندی می کند.

آزمون های آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج به کمک نرم افزار Graph

نتایج

تعیین تعداد سلول مناسب برای تیمار و رسم منحنی رشد رده های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد

به منظور تعیین تعداد سلول مناسب برای تیمار، منحنی رشد رده های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، RN95 و Nalm-6 با تعداد مختلف سلول و در بازه های زمانی صفر تا ۹۶ ساعت، با روش MTT رسم شد. با استفاده از منحنی رشد می توان زمان دو برابر شدن تعداد سلولها و همچنین تعداد سلول مناسب را برای تیمار با ۱۰-جینجروول تعیین نمود. از آنجایی که بهترین بازه زمانی برای تیمار سلولی زمانی است که سلولها مرحله رشد تأخیری را پشت سر گذاشته، فرصت دو برابر شدن را یافته و در مرحله لگاریتمی رشد یا رشد سریع قرار دارند، از این رو زمان ۷۲ ساعت برای رده های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM و RN95 و زمان ۹۶ ساعت برای رده سلولی Nalm-6 انتخاب شد. تعداد 1.05×10^5 سلول در هر میلی لیتر در حجم نهایی ۱۵۰ میکرولیتر که در آن رشد سلولها نه بسیار کند و نه بسیار سریع بود نیز برای هر چهار رده سلولی انتخاب شد (شکل ۱).

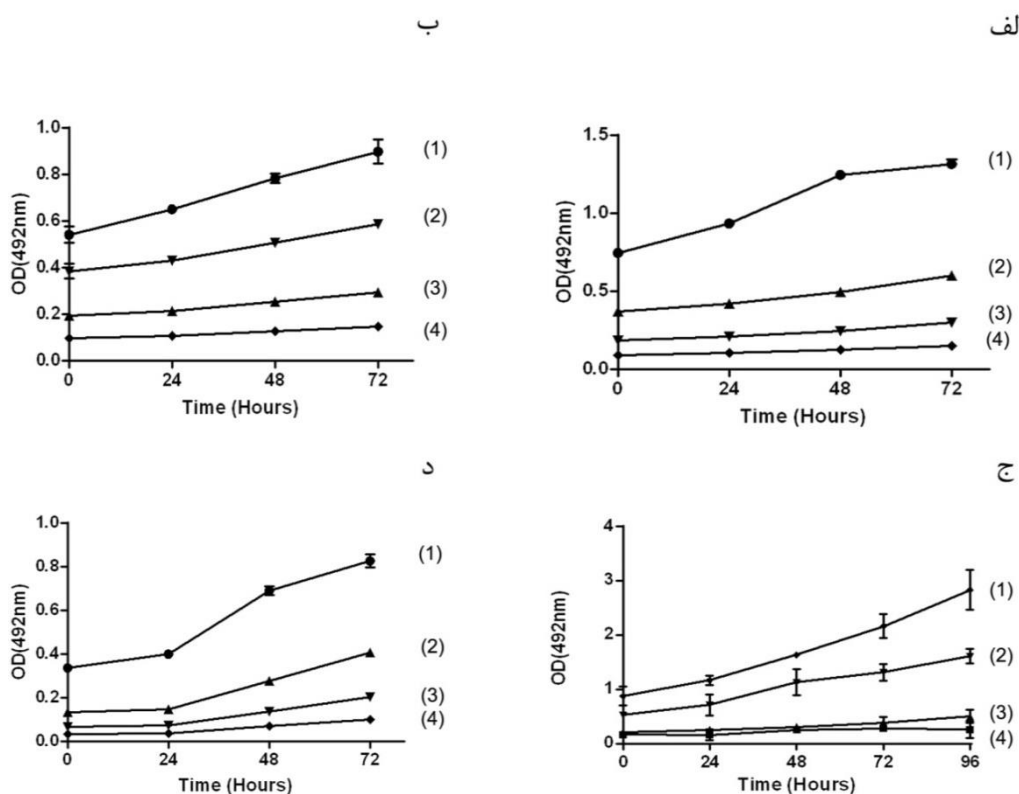
در شکل ۱ منحنی های شماره یک تا چهار در رده های سلولی CCRF-CEM (الف)، R-CCRF-CEM (ب) و RN95 (د) به ترتیب 1.05×10^5 ، 3.33×10^5 ، 1.33×10^5 ، 1.66×10^5 و 0.33×10^5 سلول در هر میلی لیتر و در رده سلولی Nalm-6 (ج) به ترتیب 1.05×10^5 ، 2.4×10^5

شد. نمونه کنترل با غلظت ۰/۴٪ از DMSO (به‌عنوان حلال ۱۰-جینجرول) تیمار شد. درصد زنده‌مانی نمونه کنترل برابر ۱۰۰ در نظر گرفته شد و درصد زنده‌مانی سایر نمونه‌ها نسبت به آن محاسبه شد. نتایج نشان داد ۱۰-جینجرول به‌صورت وابسته به غلظت سبب کاهش درصد زنده‌مانی در رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 می‌شود ($P < 0.05$). در این بین، رده سلولی Nalm-6 حساس‌ترین رده سلولی به غلظت ۲۰۰ میکرومولار از مشتق دارویی ۱۰-جینجرول بود. هر آزمایش، ۳ بار انجام شده است و در هر آزمایش نمونه‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند (شکل ۲).

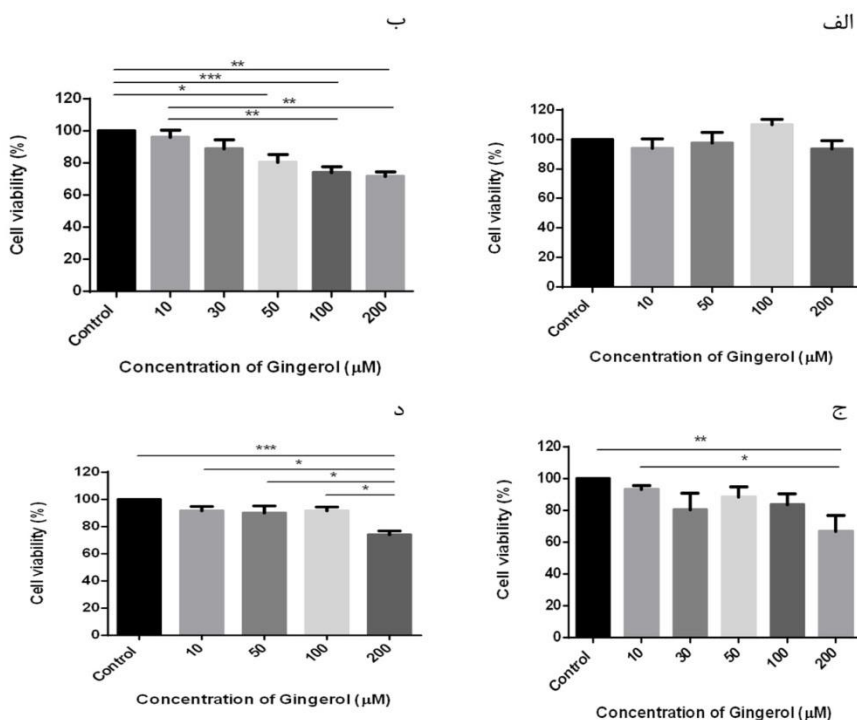
$10^5 \times 1/33$ ، $10^5 \times 0/6$ و $10^5 \times 0/3$ سلول در هر میلی‌لیتر، می‌باشند. میزان خطا در تمامی منحنی‌ها به‌صورت $mean \pm SD$ گزارش شده است.

بررسی اثر ۱۰-جینجرول بر رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد

رده‌های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 با غلظت‌های افزایشی از مشتق دارویی ۱۰-جینجرول و در بازه زمانی متناسب با زمان دو برابر شدن هر رده سلولی، تیمار شدند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش آزمون MTT و با نرم‌افزار GraphPad Prism 6 محاسبه



شکل ۱- منحنی رشد رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد

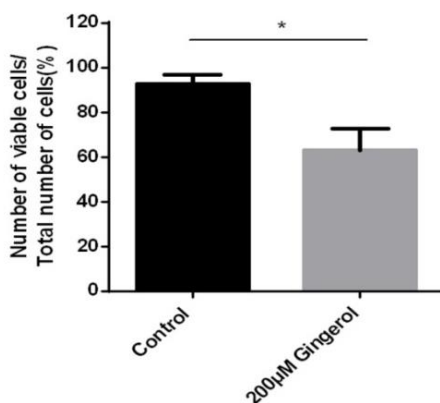


شکل ۲- نمودار زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد پس از تیمار

با غلظت‌های افزایشی ۱۰-جینجرول

شکل های الف تا د به ترتیب مربوط به رده های سلولی CCRF-CEM, R-CCRF-CEM, Nalm-6 و RN95 می باشند.

محور خطا در تمامی ستون‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$).



شکل ۳- بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی متعاقب تیمار با ۱۰-جینجرول با روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو

محور خطا در تمامی ستون‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است ($P < 0.05$).

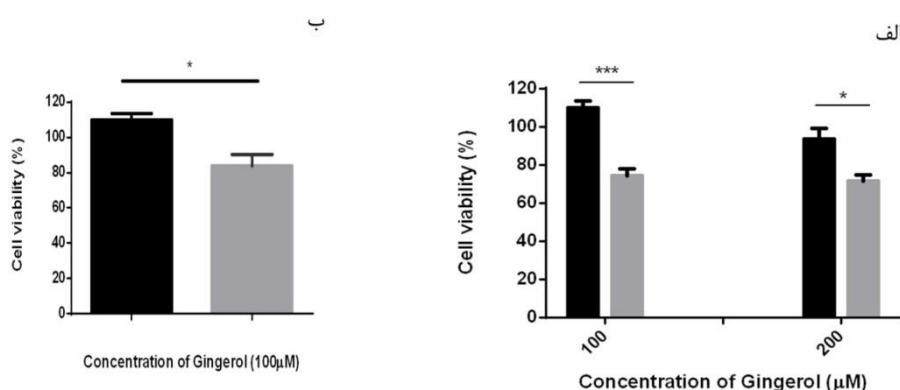
این روش سلول‌های Nalm-6 با غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۱۰-جینجرول تیمار شده و بعد میزان مرگ سلولی محاسبه

به‌منظور تأیید نتایج حاصل از MTT، میزان مرگ سلولی با روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو نیز بررسی شد. در

سلولی لوسمی لنفوبلاستی حاد نشان می‌دهد در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار ۱۰-جینجرول، زنده‌مانی رده سلولی R-CCRF-CEM نسبت به رده سلولی CCRF-CEM به ترتیب ۳۵/۷٪ و ۲۱/۷۲٪ کاهش داشت ($P < 0.05$) (شکل ۴- الف). از آنجایی که رده سلولی R-CCRF-CEM دارای مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی متوترکسات می‌باشد، از این رو اثر سیتوتوکسیک ۱۰-جینجرول بر این رده بسیار حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر این در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۱۰-جینجرول، زنده‌مانی رده سلولی Nalm-6 نسبت به رده CCRF-CEM ۲۵/۹۶٪ کاهش داشت (شکل ۴- ب). این نتایج نشان می‌دهد که ۱۰-جینجرول در غلظت‌های بالا دارای اثر مهارکنندگی متفاوتی بر زنده‌مانی رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستی حاد می‌باشد.

شد. اساس روش رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو بر این واقعیت استوار است که سلول‌های زنده دارای غشای سیتوپلاسمی سالم بوده و به علت خاصیت نفوذپذیری انتخابی غشای سلولی، رنگ تریپان‌بلو از آن عبور نمی‌کند ولی غشای سیتوپلاسمی سلول‌های مرده از بین رفته، در نتیجه رنگ تریپان‌بلو به راحتی وارد سلول شده و در نتیجه این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به رنگ آبی دیده می‌شوند (Crowley et al., 2016). نتایج حاصل از این آزمون با نتایج حاصل از آزمون MTT مطابقت داشت (شکل ۳).

مقایسه میزان اثر مهاری ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد
بررسی اثر سیتوتوکسیک ۱۰-جینجرول در رده‌های



شکل ۴- مقایسه میزان زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد

پس از تیمار با مشتق دارویی ۱۰-جینجرول

ستون‌های مشکی و خاکستری رنگ در شکل الف، به ترتیب مربوط به رده‌های سلولی CCRF-CEM و R-CCRF-CEM و

در شکل ب به ترتیب مربوط به رده‌های سلولی CCRF-CEM و Nalm-6 می‌باشند.

محور خطا در تمامی ستون‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است ($P < 0.05$ و $P < 0.001$).

جهان در مورد عملکرد ژن‌ها و پایگاه داده Enrichr استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد ۱۰-جینجرول بیشترین تأثیر را در فرایند آپوپتوز دارد (شکل ۵).

بررسی فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجرول به روش بیوانفورماتیکی
برای یافتن فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجرول از منبع GO، از بزرگترین منبع اطلاعاتی

apoptotic process (GO:0006915)
 extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:0097191)
 positive regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway (GO:1901030)
 positive regulation of protein localization to membrane (GO:1905477)
 activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process by cytochrome c (GO:0008635)
 extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors (GO:0008625)
 protein phosphorylation (GO:0006468)
 cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)
 negative regulation of apoptotic process (GO:0043066)
 positive regulation of protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway (GO:1900740)

شکل ۵- فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با ۱۰-جینجرول

رنگ روشن تر و طول بیشتر هر ردیف، نقش مؤثرتر زن‌ها و پروتئین‌ها را در فرایند بیولوژیکی مدنظر و در نتیجه ارتباط نزدیکتر ۱۰-جینجرول با فرایند بیولوژیکی مذکور نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

بحث

رده‌های سلولی ALL نشان داد که ۱۰-جینجرول به صورت وابسته به غلظت، بر رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 اثر سیتوتوکسیک دارد (شکل ۲). نتایج رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو در سلول‌های تیمار شده با ۱۰-جینجرول نیز نتایج حاصل از بررسی درصد زنده‌مانی را با روش MTT تأیید کرد (شکل ۳). با وجودی که هیچ‌یک از دو آزمون MTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو مولکول یا جزء سلول اولیه مورد هدف ۱۰-جینجرول را در یک سلول سرطانی مشخص نمی‌کنند، اما مؤید بروز اختلال در اهداف غایی این مشتق گیاهی که میتوکندری و غشای ستوپلاسمی است، می‌باشند. در مطالعات قبلی نیز اثر مهارتی و وابسته به غلظت ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطانی کلون و لوسمی پرومیلوسیتیک، به اثبات رسیده است (Wei *et al.*, 2005؛ Ryu & Chung, 2015). از آنجایی که با شناخت مهمترین مسیرهای مولکولی مرتبط با ۱۰-جینجرول، می‌توان اثر این مشتق دارویی را تشدید نمود، در این پژوهش، متعاقب بررسی اثر ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان خون لنفوبلاستی حاد، مطالعات بیوانفورماتیکی نیز به منظور یافتن نحوه تأثیر این مشتق

با وجود اثربخشی داروهای شیمی‌درمانی، سلول‌های خون‌ساز نرمال، سلول‌های اپیتلیال روده و کراتینوسیت‌های ماتریکس مو مستعد اثرهای سمی داروهای شیمی‌درمانی هستند (Sak, 2012). استفاده از گیاهان دارویی به صورت منفرد و یا در ترکیب با این داروها، عوارض جانبی ناشی از داروهای مذکور را کاهش می‌دهد (Ohnishi & Takeda, 2015). از سوی دیگر داروهای گیاهی از طریق هدف‌گیری سازوکارها و مولکول‌های متعدد، قابلیت غلبه بر مقاومت دارویی و از بین بردن سلول‌های مقاوم را دارند (Kuetze *et al.*, 2014). زنجبیل از جمله گیاهان دارویی است که اثر ضدسرطانی آن در انواع مختلفی از سرطان‌ها، از جمله سرطان خون لنفوبلاستی حاد به اثبات رسیده است (Babasheikhali *et al.*, 2019). از آنجایی که این گیاه دارای ترکیب‌های متنوعی می‌باشد، در این پژوهش برای اولین بار نقش ۱۰-جینجرول به‌عنوان یکی از فعال‌ترین مشتقات زنجبیل، بر سرطان خون لنفوبلاستی حاد مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش بررسی اثر ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی

MDR1 اشاره کرد. MDR1 یک پروتئین غشایی است که نقش مهمی در مقاومت دارویی چندگانه (MDR: Multi drug resistance) دارد. براساس مطالعه انجام شده بر میزان بیان ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی، در لوسمی لنفوبلاستی حاد کودکان، مشخص شده است که در بیماران $\text{mdr}+$ بیان ژن *MDR1* افزایش می‌یابد (Rahgozar et al., 2014). NF- κ B به‌عنوان فاکتور رونویسی *MDR1* سبب افزایش رونویسی از این ژن می‌شود (Bentires-Alj et al., 2003). از آنجایی که ۱۰-جینجرول سبب مهار NF- κ B می‌شود، این مشتق گیاهی می‌تواند اثر سیتوتوکسیک خود را بر رده سلولی R-CCRF-CEM از طریق این مسیر نیز ایفاء کند. البته در این زمینه تحقیقات بیشتری برای اثبات ادعای مذکور مورد نیاز است.

در این مطالعه همچنین نشان داده شد که اثر مهارى ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی رده سلولی Nalm-6 از CCRF-CEM بیشتر می‌باشد (شکل ۴-ب). مطالعات قبلی ما در مورد داروی RG7388 که یک مهارکننده انتخابی MDM2 بوده و از اتصال p53 و MDM2 و در نتیجه تجزیه p53 ممانعت می‌کند، نشان می‌دهد که ژن p53 در رده سلولی CCRF-CEM دچار موتاسیون شده است، زیرا داروی RG7388 بر میزان پروتئین p53 در این رده سلولی تأثیری نداشته است. این در حالیست که RG7388 سبب افزایش میزان پروتئین p53 در رده سلولی Nalm-6 می‌شود. علت این امر وجود پروتئین p53 طبیعی در این رده سلولی می‌باشد (Zanjirband et al., 2020). بنابراین یکی از علل تفاوت در اثر سیتوتوکسیک ۱۰-جینجرول بر رده سلولی Nalm-6 در مقایسه با رده سلولی CCRF-CEM، می‌تواند موتاسیون در ژن p53 در رده سلولی CCRF-CEM باشد که سبب ممانعت از عملکرد ۱۰-جینجرول بر مسیر پیام‌رسانی p53 می‌شود. بنابراین برای اثبات این ادعا، انجام مطالعات بیشتر و آزمایش‌های تکمیلی ضروریست.

مطالعات نشان می‌دهد که گیاه دارویی زنجبیل سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. در میان ترکیبات مختلف این گیاه، ترکیبات فنولی نقش مهمی در

دارویی بر سلول‌های سرطانی انجام شد. با توجه به آنکه سلول‌های سرطانی در انواع مختلف سرطان‌ها برای رشد و تکثیر خود اغلب مسیرهای سیگنالی خاصی را مورد هدف قرار می‌دهند و هر یک از مشتقات گیاه دارویی زنجبیل نیز بر سازوکارهای مولکولی خاصی اثر بیشتری دارند، نتایج بدست‌آمده از مطالعات بیوانفورماتیکی امکان یافتن مهمترین فرایندهای بیولوژیکی مرتبط با این مشتق دارویی و در نتیجه تمرکز مطالعات آزمایشگاهی بعدی را بر این فرایندها میسر می‌کند. مطالعات بیوانفورماتیکی با استفاده از منبع GO و پایگاه داده Enrichr نشان داد که اثر ۱۰-جینجرول بر کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان خون لنفوبلاستی حاد می‌تواند از طریق القای آپوپتوز در این سلول‌ها باشد. به‌عبارت دیگر نتایج بدست‌آمده از آزمون MTT که بیانگر مهار آنزیم‌های اکسیدوردوکنزازی وابسته به NADPH توسط ۱۰-جینجرول می‌باشد، می‌تواند ناشی از القای آپوپتوز و ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری توسط این مشتق گیاهی در سلول سرطانی باشد.

Peng و همکارانش (۲۰۱۲)، با مطالعه اثر سمی ۱۰-جینجرول بر رده‌های سلولی HL60 (لوسمی پرومیلوسیتیک) و K562 (لوسمی گرانولوسیتی مزمن) نشان دادند که غلظتی از ۱۰-جینجرول که سبب کاهش ۵۰ درصدی زنده‌مانی می‌شود (IC50: half-maximal concentrations of proliferation inhibition) در این دو رده به ترتیب $10/3 \pm 75/4$ و $8/7 \pm 112/5$ است. البته اثر متفاوت ۱۰-جینجرول بر رده‌های سلولی می‌تواند به مسیرهای پیام‌رسانی مختلف در این سلول‌ها مربوط باشد. مطالعات نشان می‌دهد ۱۰-جینجرول می‌تواند از طریق فعال‌سازی p53، مهار مسیر پیام‌رسانی NF- κ B و القای آپوپتوز مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی شود (Ryu & Chung, 2015; Zhang et al., 2017). در این مطالعه، اثر مهارى ۱۰-جینجرول بر زنده‌مانی رده سلولی R-CCRF-CEM از رده سلولی CCRF-CEM بیشتر بود (شکل ۴-الف). ازجمله سازوکارهای مقاومت دارویی در رده سلولی R-CCRF-CEM می‌توان به افزایش بیان

- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P. and Bours, V., 2003. NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*, 22: 90-97.
- Bernard, M.M., McConnery, J.R. and Hoskin, D.W., 2017. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Experimental and Molecular pathology*, 102: 370-376.
- Butt, M.S. and Sultan, M.T., 2011. Ginger and its health claims: molecular aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 383-393.
- Crowley, L.C., Marfell, B.J., Christensen, M.E. and Waterhouse, N.J., 2016. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7): 643-646.
- Dugasani, S., Pichika, M.R., Nadarajah, V.D., Balijepalli, M.K., Tandira, S. and Korlakunta, J.N., 2010. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 515-520.
- Fuzer, A.M., Lee, S.Y., Mott, J.D. and Cominetti, M.R., 2017. [10]-Gingerol reverts malignant phenotype of breast cancer cells in 3D culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118: 2693-2699.
- Joo, J.H., Hong, S.S., Cho, Y.R. and Seo, D.W., 2016. 10-Gingerol inhibits proliferation and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells through suppression of Akt and p38MAPK activity. *Oncology Reports*, 35: 779-784.
- Karna, P., Chagani, S., Gundala, S.R., Rida, P.C., Asif, G., Sharma, V., Gupta, M.V. and Aneja, R., 2012. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. *British Journal of Nutrition*, 107: 473-484.
- Kim, J.S., Im Lee, S., Park, H.W., Yang, J.H., Shin, T.Y., Kim, Y.C., Baek, N.I., Kim, S.H., Choi, S.U. and Kwon, B.M., 2008. Cytotoxic components from the dried rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. *Archives of Pharmacal Research*, 31: 415.
- Kuete, V., Tankeo, S.B., Saeed, M.E., Wiench, B., Tane, P. and Efferth, T., 2014. Cytotoxicity and modes of action of five Cameroonian medicinal plants against multi-factorial drug resistance of tumor cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 153: 207-219.
- Ohnishi, S. and Takeda, H., 2015. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 14.
- Peng, F., Tao, Q., Wu, X., Dou, H., Spencer, S., Mang, C., Xu, L., Sun, L., Zhao, Y. and Li, H., 2012. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia*, 83: 568-585.

القای آپوپتوز ایفاء می‌کنند (Rhode *et al.*, 2006؛ Karna *et al.*, 2012؛ Abdullah *et al.*, 2010). نتایج حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی در این پژوهش نیز حکایت از تأثیر ۱۰-جینجرول بر فرایند آپوپتوز دارد (شکل ۵). بنابراین با تکیه بر استفاده از مشتقات فعال گیاهان دارویی، برای مقابله با لوسمی لنفوبلاستی حاد که بیماری شایع و مهلکی در بین کودکان می‌باشد، نتایج این پژوهش از اهمیت خاصی برخوردار است. امید است با استفاده از مشتقاتی همانند ۱۰-جینجرول، به صورت منفرد یا در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی گامی در جهت کمک به درمان بیماران مبتلا به ALL با بیشترین تأثیر و کمترین عوارض جانبی برداشته شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه اصفهان (به شماره ۹۷/۱۴۲۵۵)، برای انجام پایان‌نامه دانشجویی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد (به شماره ۱۵/۲۵۱۷) انجام شده است. از همکاری دست‌اندرکاران این مجموعه‌ها قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abdullah, S., Abidin, S.A.Z., Murad, N.A., Makpol, S., Ngah, W.Z.W. and Yusof, Y.A.M., 2010. Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *African Journal of Biochemistry Research*, 4: 134-142.
- Abedi, M., Rahgozar, S. and Esmaeili, A., 2020. Iron protects childhood acute lymphoblastic leukemia cells from methotrexate cytotoxicity. *Cancer Medicine*, 9(1): 1-14.
- Akimoto, M., Iizuka, M., Kanematsu, R., Yoshida, M. and Takenaga, K., 2015. Anticancer effect of ginger extract against pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death. *PloS ONE*, 10(5): e0126605.
- Babasheikhali, S.R., Rahgozar, S. and Mohammadi, M., 2019. Ginger extract has anti-leukemia and anti-drug resistant effects on malignant cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145: 1987-1998.

- Sak, K., 2012. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012: 282570.
- Sang, S., Hong, J., Wu, H., Liu, J., Yang, C.S., Pan, M.-H., Badmaev, V. and Ho, C.T., 2009. Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from *Zingiber officinale* relative to gingerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 10645-10650.
- Semwal, R.B., Semwal, D.K., Combrinck, S. and Viljoen, A.M., 2015. Gingerols and shogaols: important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117: 554-568.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66: 7-30.
- Sylvester, P.W., 2011. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability: 157-168. In: Satyanarayanajois, S.D., (Ed.). *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*. Springer, 284p.
- Wei, Q.Y., Ma, J.P., Cai, Y.J., Yang, L. and Liu, Z.L., 2005. Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 177-184.
- Zanjirband, M., Rahgozar, S. and Aberuyi, N., 2020. miR-16-5p affects sensitivity to RG7388 (Idasanutlin) through p53-WIP1 feedback loop in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Submitted in *Molecular and Cellular Pediatrics*.
- Zhang, F., Thakur, K., Hu, F., Zhang, J.G. and Wei, Z.J., 2017. 10-Gingerol, a phytochemical derivative from "tongling white ginger", inhibits cervical cancer: insights into the molecular mechanism and inhibitory targets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 2089-2099.
- Pieters, R. and Carroll, W.L., 2008. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 55: 1-20.
- Prasad, S. and Tyagi, A.K., 2015. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015(11): 142979.
- Pui, C.H., 2010. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the Formosan Medical Association*, 109: 777-787.
- Pui, C.H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B. and Schmiegelow, K., 2015. Childhood acute lymphoblastic leukemia: progress through collaboration. *American Society Journal of Clinical Oncology*, 33(27): 1-11.
- Rahgozar, S., Moafi, A., Abedi, M., Entezar-e-ghaem, M., Moshtaghian, J., Ghaedi, K., Esmaeili, A. and Montazeri, F., 2014. mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biology & Therapy*, 15: 35-41.
- Rhode, J.M., Huang, J., Fogoros, S., Tan, L., Zick, S. and Liu, J.R., 2006. Ginger induces apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Proceedings of the American Association Cancer Research*, 47: 4510.
- Ryu, M.J. and Chung, H.S., 2015. [10]-Gingerol induces mitochondrial apoptosis through activation of MAPK pathway in HCT116 human colon cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 51: 92-101.
- Safarzadeh, E., Shotorbani, S.S. and Baradaran, B., 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4: 421-427.

Study on the cytotoxic effect of 10-gingerol, a derivative of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), on acute lymphoblastic leukemia cell lines

S. Najafi Dorcheh¹, S. Rahgozar^{2*}, D. Talei³ and E.S. Ghodousi⁴

1- Ph.D. student, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2*- Corresponding author, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, E-mail: rahgozar@sci.ui.ac.ir

3- Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

4- M.Sc. graduated, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: June 2020

Revised: December 2020

Accepted: December 2020

Abstract

Chemotherapy, as the most common way of cancer treatment, has many side effects that make it difficult to continue the treatment process. The studies show that the use of medicinal plants alone or in combination with the chemotherapy drugs can reduce the harmful effects of chemotherapy. This study aimed at investigating the effect of 10-gingerol, as one of the major derivatives of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), on the acute lymphoblastic leukemia cell lines. The acute lymphoblastic cell lines (CCRF-CEM, R-CCRF-CEM, Nalm-6, and RN95) were treated with increasing concentrations of 10-gingerol after drawing their growth curves. The survival percentage was evaluated by the MTT assay. In addition, the trypan blue staining method was used to evaluate the rate of cell death and confirm the results of MTT assay. To explore the biological processes, molecular function, and cellular components related to the 10-gingerol target genes, a functional annotation analysis was performed using the gene ontology (GO) and Enrichr (a comprehensive gene set enrichment analysis tool) database. The Graph Pad Prism 6 software was also used for statistical analyses. The results of this study indicated that 10-gingerol had a cytotoxic effect on R-CCRF-CEM, Nalm-6, and RN95 cell lines significantly ($P < 0.05$). This effect was stronger in R-CCRF-CEM and Nalm-6 than in CCRF-CEM at the higher concentrations. The GO analyses also recognized the apoptosis as the most important biological process associated with 10-gingerol. In the present study, for the first time, the cytotoxic effect of 10-gingerol on the acute lymphoblastic leukemia cell lines was demonstrated.

Keywords: Chemotherapy, ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), 10-gingerol, acute lymphoblastic leukemia.