

بررسی ۶-جینجرول در عصاره کامل زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe.*) و اثرهای مولکولی آن بر رده سلولی *HTC-116* سرطان کلورکتال

طاهره سلیمانی^۱، آسا ابراهیمی^{۲*}، فروزنده محجوبی^۳ و مهدی صادقی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: dr.asaebrahimi@gmail.com

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

چکیده

زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe.*) یک گیاه دارویی ادویه‌ای است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتوموری و ضد سرطانی می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر عصاره اتانولی ریزوم زنجبیل تازه بر مهار سلول‌های سرطانی رده بزرگ *HCT-116* و نیز بیان ژن‌های *TGFBR2* و *DDC* به‌عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و ژن β -*Actin* به‌عنوان ژن مرجع انجام شد. برای شناسایی و اندازه‌گیری میزان ۶-جینجرول در عصاره از آنالیز HPLC استفاده شد. بررسی اثر سمیت غلظت‌های مختلف عصاره کامل (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی رده سلولی *HTC-116* به کمک آزمون MTT بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت از شروع آزمون ارزیابی شد. بررسی بیان ژن‌های *DCC*، *TGFBR2* و β -*Actin* به روش RT-PCR پس از تیمار با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره کامل بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت از شروع آزمون انجام شد. نتایج HPLC نشان داد که ۶-جینجرول به میزان $2/03 \pm 86/2$ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک پودر عصاره اتانولی زنجبیل وجود داشت. نتایج آزمایش MTT نشان داد که IC_{50} بعد از ۱۶ ساعت، ۸۰/۴۴ و بعد از ۲۴ ساعت، ۴۷۳/۱۹ بدست آمد. در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره، مرگ و میر سلولی به‌طور افزایشی تغییر چشمگیر داشت. همچنین، افزایش بیان ژن‌های *TGFBR2* و *DCC* در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در هر دو زمان ۲۴ و ۱۶ ساعت معنی‌دار ($P < 0/01$) بود. این تحقیق بیانگر اثر القای ژن‌های بازدارنده تومور بر اثر استفاده از عصاره زنجبیل در سرطان رده بزرگ رده سلولی *HCT-116* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe.*)، ۶-جینجرول، سرطان کلورکتال، رده سلولی *HCT-116*

مقدمه

دنیاست. گیاهان با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود موجب حفظ سلامتی و همچنین درمان بیماری‌ها می‌شوند (Sivalokanathan et al., 2006). در بین گیاهان دارویی

سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است. سرطان کولورکتال سومین شایع در مردان و زنان در

در داخل و خارج سلول می‌شوند (Lee et al., 2015). هدف از این تحقیق، بررسی اثر عصاره کامل همراه با پوست زنجبیل از نظر میزان ۶-جینجرول و تأثیر آن بر روی رده سلولی HCT-116 از نظر مورفولوژیکی و مولکولی در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

زنجبیل با نام علمی *Zingiber officinale* از خانواده Zingiberaceae است. زنجبیل تازه از بازار تهیه شد و در آزمایشگاه بوتانیک دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تأیید گردید. ریزوم زنجبیل تازه همراه با پوست پس از شستشو و خرد شدن در آن به‌طور کامل خشک و به‌صورت پودر استفاده شد. نسبت ۱ به ۲۵ از پودر زنجبیل و الکل ۷۰٪ محلول به مدت سه ساعت در مکان تاریکی نگهداری شد. محلول از کاغذ صافی (واتمن ۱) عبور داده شد. عصاره حاصل ابتدا برای مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو با قدرت بالا قرار گرفت و بعد عصاره در روتاری دور ۳۰ دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و فشار مطابق با حلال قرار گرفت تا الکل آن تبخیر شود و عصاره خالص باقی ماند. عصاره خالص برای خشک شدن در انکوباتور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. برای استفاده در قسمت‌های بعدی تحقیق، حل کردن عصاره خشک در آب مقطر استریل با کمک حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

آنالیز با دستگاه HPLC

عصاره بدست آمده با دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) مدل e2696 شرکت واترز آمریکا مورد آنالیز قرار گرفت. سیستم شامل یک آشکارساز PDA 2998 دارای ستون C18، با اندازه ذرات ۵ میکرومتر بود. نمونه استاندارد تزریق شده به دستگاه از شرکت سیگما الدریج (gingerol- G 1046-10 MG [6]) تهیه شد. برای فاز

عصاره زنجبیل که دارای ترکیب‌های مختلف مانند جینجرول‌ها، سزکویی‌ترین‌ها و شوگائول که آنتی‌اکسیدان است، سبب حذف رادیکال‌های آزاد در بدن می‌گردد (Heydarieh & Faraji, 2014; Tchombe et al., 2012). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی زنجبیل روی رده سلولی 4TI (عامل سرطان پستان) بررسی گردید و نشان داده شد که عصاره زنجبیل و داروی تاکسول به‌طور مشابه بر روی سلول‌های سرطانی دارای اثرهای سایتوتوکسیک قابل توجهی هستند (Farahani et al., 2013). ۶-جینجرول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالاست. اثر ضد سرطانی ۶-جینجرول بر روی لاین سلولی SW-480 (مولد سرطان روده بزرگ) بررسی و اثبات شده است (Prasad & Tyagi, 2015; Radhakrishnan et al., 2014). ژن‌های مختلفی در سرطان کلورکتال شناسایی شده‌اند که از این میان اثر عصاره‌های گیاهی غیرسمی در غلظت‌های مناسب می‌تواند باعث افزایش یا کاهش بیان آنها شود. همچنین می‌تواند نقش مهمی در کنترل پیشرفت سرطان داشته باشد (Jung & Ellis, 2001). ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (Tumor suppressor genes)، برای نمونه *DCC*، *P53* و *TGFBR2* ژن‌هایی هستند که در مسیر بیماری از سلول محافظت می‌کنند. *P53* با ایجاد مانع در چرخه سلولی و آپوپتوز هنگامی که سلول‌های سالم در معرض تهاجم سلول‌های سرطانی قرار گرفتند، بیان ژن *P53* افزایش پیدا می‌کند و با ایجاد آپوپتوز و مرگ سلولی از سلول محافظت می‌کند (Noori Dalooi & Abdollahzade, 2014). در بیش از ۷۰٪ از کارسینوما کلورکتال حذف آلسی در کروموزوم ۱۸ مشاهده شده است. ژن اولیه و اصلی برای این ناحیه، حذف شده در کارسینوم کولورکتال به نام (*DCC*) خوانده می‌شود که شناسایی و همسانه‌سازی شده است. ژن *DCC* در غشای مخاطی کلون طبیعی بیان می‌شود، اما در کارسینوم کلورکتال بیان نمی‌شود یا در صورت بیان مقدار آن کاهش می‌یابد. اما در برخی از سرطان‌ها این ژن بیان نمی‌شود (Martín et al., 2006). ژن *TGFBR2* (*Transforming growth factor beta*) نوعی سرکوب‌کننده تومور است. گروه *TGF-β* نوعی سیتوکین هستند که در سیگنال‌دهی سلولی نقش دارند و هنگام رونویسی باعث افزایش و کاهش سطح پروتیین

نامحلول فورمازان که بنفش‌رنگ است تبدیل و کریستالی می‌شود. کیت MTT از شرکت ایده زیست نو ترکیب ساخت ایران تهیه شد. از عصاره زنجبیل ۱۰ غلظت متفاوت تهیه شد که این غلظت‌ها بین ۱۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. آزمایش برای مدت ۱۶ و ۲۴ ساعت بررسی شد. در این بررسی از پلیت‌های ۹۶ تایی برای هر غلظت سه تکرار و ۸۰۰۰ سلول در هر چاهک در نظر گرفته شد. در نهایت پس از اعمال تیمار درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۰٪ و دی‌اکسیدکربن ۵٪ قرار گرفتند (Bondarian et al., 2019). در پایان توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. میزان بازدارندگی یا IC₅₀ عصاره زنجبیل بر روی سلول‌های مورد نظر از طریق فرمول Hill بر روی coindex محاسبه گردید (Spiess & Neumeyer, 2010; Sebaugh, 2011; Finney, 1952).

$$Y = \frac{\text{Max}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{\text{Hill coefficient}}}$$

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA بر روی سلول‌های تیمار شده با ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره کامل در زمان‌های ۱۶ و ۲۴ ساعت از طریق کیت شرکت Roche ساخت کشور آلمان انجام شد. کمیّت و کیفیت RNA از طریق ژل آگارز توسط دستگاه نانودراپ مورد بررسی و در مرحله بعدی سنتز cDNA از RNA استخراج شده به وسیله کیت شرکت پارس توس مشهد (www.parstous.com) بدست آمد. برای آنالیز بیان ژن‌های اصلی *TGFBR2* و *DCC* و ژن *B-Actin* به‌عنوان ژن مرجع و پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار oligo5 طراحی و توسط پایگاه NCBI و BLAST اجرا شد. بعد از طراحی پرایمرها، سنتز توالی‌های آنها به وسیله شرکت رویین طب‌گستر انجام شد. توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ آمده است. در نهایت بیان ژن‌های *TGFBR3*، *DCC* و *B-Actin* با روش RT-PCR بررسی شد.

متحرک ایزوکراتیک از متانول و آب به نسبت ۹ به ۱ استفاده گردید. سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج دستگاه ۲۸۲ نانومتر تنظیم شد (Cafino et al., 2016). حجم نمونه‌ها برای تزریق ۱۰ میلی‌لیتر و زمان ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد و برای رسم منحنی کالیبراسیون ۵ غلظت مختلف (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm) از استاندارد ۶-جینجروول به دستگاه تزریق گردید. برای تعیین غلظت ۶-جینجروول با کمک نرم‌افزار اکسل منحنی استاندارد کالیبراسیون رسم و پس از تزریق نمونه‌های اصلی مقدار ماده ۶-جینجروول در آنها محاسبه شد. غلظت ۶-جینجروول موجود در هر نمونه با استفاده از فرمول زیر بدست آمد.

$$C(u) = A(u) \times C(st) / A(st)$$

$C(u)$: غلظت نمونه ناشناس؛ $A(u)$: سطح زیر پیک یا گرام نمونه ناشناس؛ $C(st)$: غلظت نمونه استاندارد؛ $A(st)$: سطح زیر پیک نمونه استاندارد. پس از تزریق عصاره و محاسبه سطح زیر منحنی در فرمول رابطه خط ذکر شده میزان ۶-جینجروول محاسبه شد.

کشت سلولی

سلول‌های اپیتلیالی سرطان روده بزرگ *HCT-116* از بانک سلولی مؤسسه ملی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شد و در محیط DMEM 10 درصد غنی شده با سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک پن استرپ شامل (استرپتومایسین و پنی‌سیلین) کشت گردید. شرایط رشد سلولی شامل دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵٪ و رطوبت ۷۵٪ به بالا بود.

آزمون MTT

برای تعیین درصد زنده‌مانی سلولی از آزمون MTT یا تکنیک رنگ‌سنجی MTT assay [۳-۵،۴-دی‌متیل تiazول (۲-یل)-۲-۵-دی‌فنیل تترازولیوم] استفاده گردید. این نمک زردرنگ (تترازولیوم) در اثر فعالیت میتوکندریایی همراه با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و سیتوکروم اکسیداز به نمک

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

Table 1. Primer sequence of target and reference genes

Primer	GC%	Sequence	Annealing TM°C
DCC	50	F:5'-CAA GCC AGA TGA GGG ACT TTA C-3'	60.10
	45.5	R:5'-GAA CCT CAG TGG TCC TGC TAC T-3'	59.90
TGFB2	50	F:5'-GAG GTC TAT AAG GCC AAG CTG A-3'	59.5
	50	R:5'-TCC TTC TCT GTC TTC CAAGAG G-3'	60
B-Actin	50	F:5'GATCAGCAAGCAGGAGTATGAC-3'	60
	52.4	R:5'CCAATCTCATCTTGTTTCTGC-3	68.8

مختلف از آزمون (2 tailed, Sig) t test در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ و $P < 0.01$ استفاده شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS Version 22 و برای رسم نمودارها از Excel 2016 استفاده شد.

نتایج

بررسی عصاره‌های گیاه زنجبیل

دستگاه HPLC براساس پنج نمونه آزمون استاندارد ایتیمایز شد و نمودار کالیبراسیون (شکل ۱) دست‌گام می‌باشد و میزان R^2 آن برابر 0.9897 بدست آمد. شکل ۱، منحنی کالیبراسیون و رابطه خط استانداردهای ۶-جینجرول برای اندازه‌گیری جذب رادیکال‌های آزاد با توجه به غلظت‌های صفر تا 2000 رابطه خط رگرسیون برای بردار ۶-جینجرول میزان R^2 که در واقع ضریب تشخیص (Coefficient of Determination) می‌باشد، برابر 0.9897 بدست آمد (شکل ۱). نتایج HPLC نشان داد که میزان ۶-جینجرول در پودر عصاره $2/03 \pm 86/2$ میلی‌گرم در 100 گرم وزن خشک پودر عصاره زنجبیل اتانولی بود. شکل ۲ کروماتوگرافی استاندارد مقدار ۶-جینجرول و شکل ۳ کروماتوگرافی نمونه عصاره زنجبیل را نشان می‌دهد.

آزمون RT-PCR

این آزمایش برای هر ژن و همچنین ژن مرجع با سه تکرار بیولوژیک و تکرار تکنیکال برای تمام زمان‌ها و تمام غلظت‌ها بررسی شد. برای آنالیز داده‌های حاصل از این آزمون از روش Ct مقایسه‌ای ($\Delta\Delta Ct$) استفاده شد. این روش شامل تعیین مقدار بیان ژن و استاندارد کردن آن با یک ژن مرجع می‌باشد. استاندارد کردن برای تصحیح و حذف اختلاف‌های موجود در بازده تکثیر، شرایط تخلیص و مقدار حجم اولیه نمونه انجام می‌گردد. در این روش تغییرات بیان ژن، به صورت مقدار تفاوت نسبی بین نمونه مورد نظر و کالیبراتور محاسبه می‌شود. سپس تغییرات بیان این ژن نسبت به ژن مرجع در هر دو تیمار مورد نظر بررسی می‌شود.

$$\text{Fold difference} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$-\Delta Ct_{\text{control}} = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$$

$$-\Delta Ct_{\text{calibrator}} = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{target}}$$

$$-\Delta Ct_{\text{calibrator}} = \Delta Ct_{\text{control}} - \Delta Ct_{\text{target}}$$

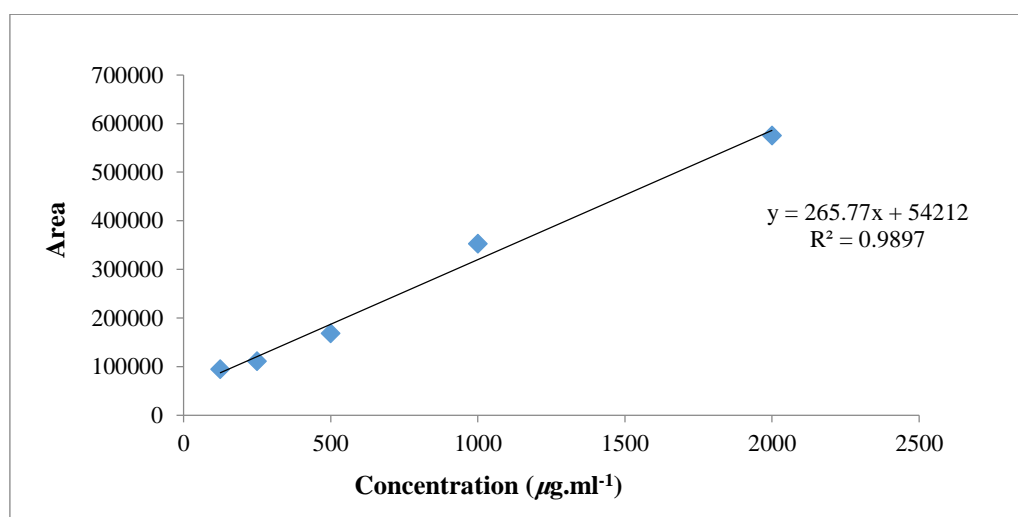
در این فرمول، sample نمونه مورد نظر ما می‌باشد و control نمونه شاهد است. همچنین منظور از Ct_{target} ، $Ct_{\text{calibrator}}$ و Ct_{control} ژن $\beta\text{-actin}$ می‌باشد. کلیه داده‌های محاسبه شده به صورت میانگین \pm خطا استاندارد بیان شده است و برای تعیین معنی‌داری بین تیمارهای

نتایج MTT

سنجش بقای سلولی به روش MTT از پرکاربردترین روش‌های مطالعات سلولی محسوب می‌شود. در این روش تشکیل رنگ به‌عنوان نشانگر سلول‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. شدت رنگ تولید شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطان روده بزرگ رده *HCT-116* در ۱۶ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با ۱۰ غلظت مختلف عصاره اتانولی با افزایش غلظت عصاره‌ها روند کاهشی داشت. نتایج آزمایش MTT نشان داد که IC_{50} براساس شاخص هیل (Hill Coeindex) برای ۱۶ ساعت ۸۰/۴۴۵۶ و برای ۲۴ ساعت ۴۷۳/۱۸۸۷ بدست آمد که مرگ و میر سلولی

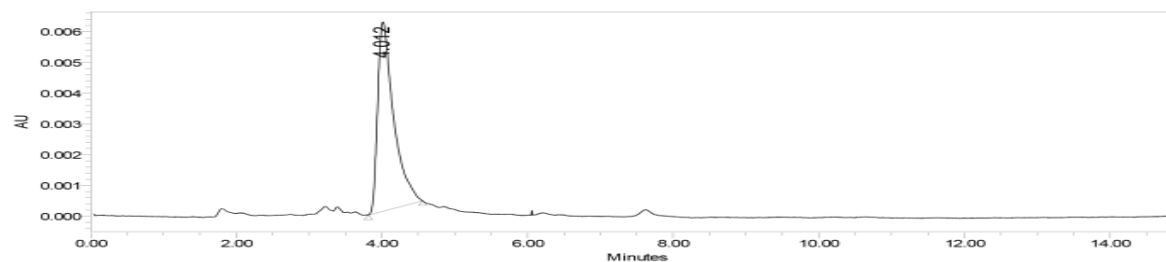
به‌طور افزایشی تغییر چشمگیر داشت. نتایج آزمون MTT در ۱۶ ساعت نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ۷۷/۹۶٪ بود و بعد از آن درصد بازدارندگی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۷۲/۴۵٪ بود. کمترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۹/۶٪ دیده شد (شکل ۴).

نتایج آزمون MTT در ۲۴ ساعت نشان داد که در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد بازدارندگی در محدوده ۸۱/۲۷٪ قرار داشت. ولی در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد بازدارندگی ۷۳/۹٪ بود (شکل ۵).



شکل ۱- منحنی کالیبراسیون و معادله خط استاندارد ۶-جینجرول

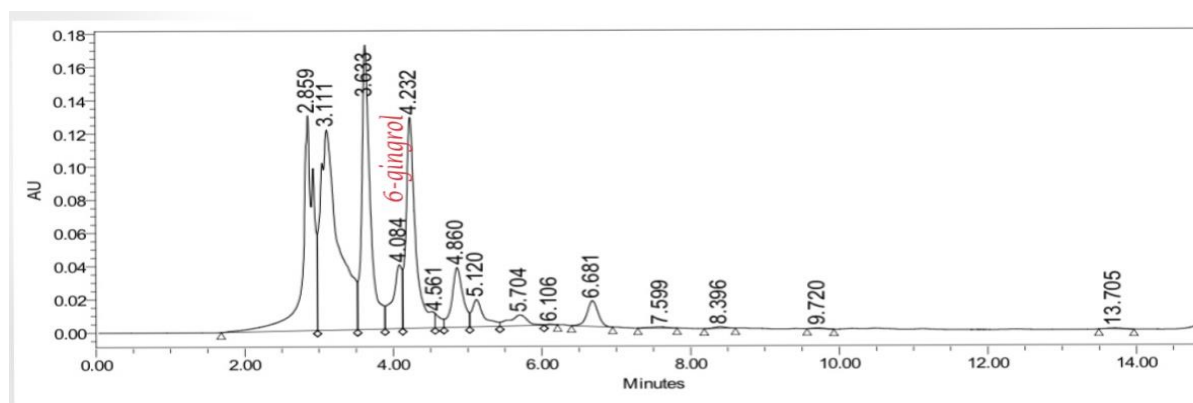
Figure 1. Calibration curve and standard line equation of 6-gingerol



	RT	Area	% Area	Height
1	4.012	94491	100.00	6159

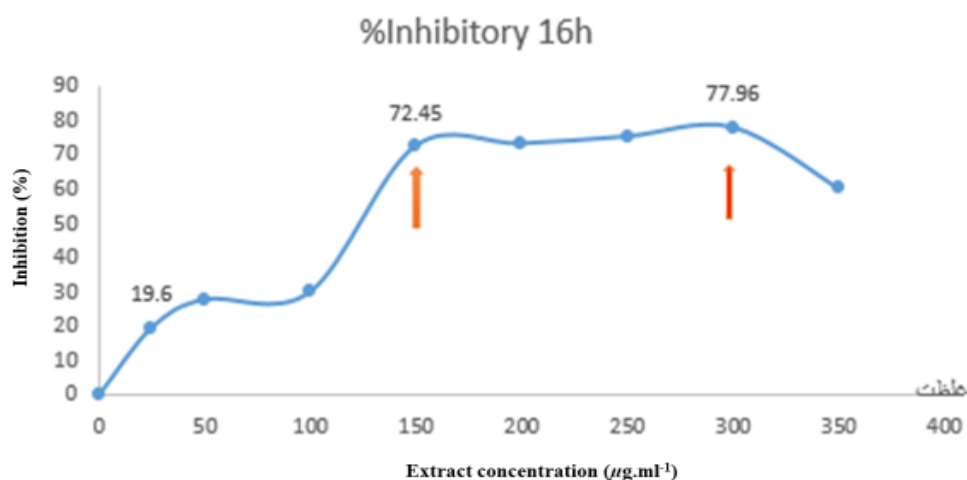
شکل ۲- کروماتوگرافی استاندارد مقدار ۶-جینجرویل

Figure 2. Standard chromatogram of the amount of 6-gingerol



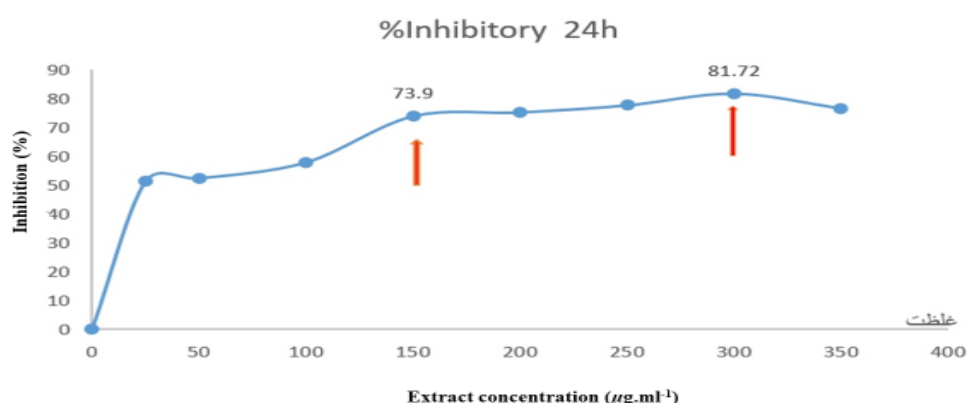
شکل ۳- کروماتوگرافی نمونه زنجبیل

Figure 3. Chromatogram of ginger sample



شکل ۴- درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره کامل زنجبیل روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ *HCT-116* پس از ۱۶ ساعت از شروع تست MTT

Figure 4. Inhibition percentage of different ethanol complete extract concentrations of *Zingiber officinale* on *HCT-116* colon cancer cells, 16 hours after start of MTT test



شکل ۵- درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره کامل اتانولی زنجبیل روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ *HCT-116* پس از ۲۴ ساعت از شروع تست MTT

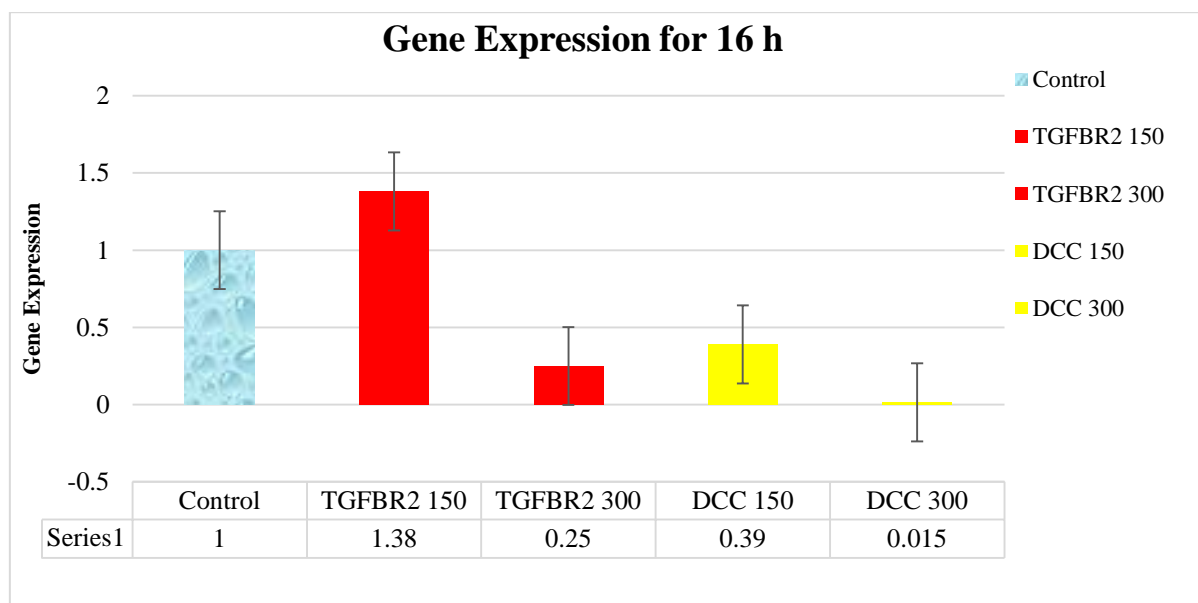
Figure 5. Inhibition percentage of different ethanol complete extract concentrations of *Zingiber officinale* on *HCT-116* colon cancer cells, 24 hours after start of MTT test

در میلی‌لیتر بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود بعد از ۱۶ ساعت از شروع تیمار بیان ژن *DCC* در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۰/۳۹٪ کاهش داشته است. کاهش بیان این ژن از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بیان ژن‌های *DCC* و *TGFBR2* در مدت زمان ۱۶ ساعت بیان ژن‌های *DCC* و *TGFBR2* در دو آزمایش، در سلول‌های سرطانی بدون تیمار و سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره زنجبیل با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم

زنجبیل افزایش نشان داد که این افزایش بیان با میزان ۱/۳۸٪ از نظر آماری معنی دار بود. بیان ژن *TGFBR2* در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به میزان ۰/۲۵٪ نسبت به شاهد کاهش بیان غیرمعنی دار نشان داد.

به نحوی که بیان ژن *DCC* در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره زنجبیل نیز میزان ۰/۱۵٪ کاهش داشته است و هیچ گونه تغییر معنی داری مشاهده نشد. بیان ژن *TGFBR2* در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره



شکل ۶- تأثیر غلظت های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره کامل اتانولی زنجبیل روی بیان ژن های *TGFBR2* و *DCC*

β -Actin پس از ۱۶ ساعت از شروع تست MTT

Figure 6. Effects of ethanol complete extract concentrations of *Zingiber officinale* on expression of *TGFBR2*, *DCC*, and β -Actin genes, 16 hours after start of MTT test

بود. بیان ژن *TGFBR2* در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر با عصاره زنجبیل ۱۱/۸۳٪ افزایش بیان نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود.

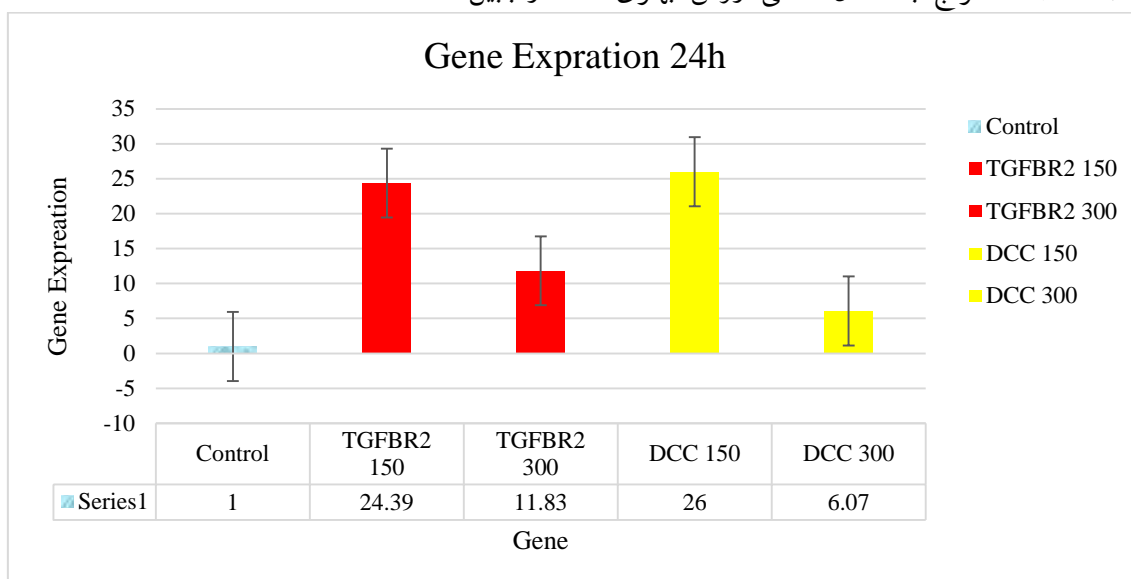
بحث

با توجه به تأثیر نوع حلال و روش عصاره گیری و سایر عوامل فیزیکی بر ترکیب های عصاره زنجبیل، HPLC نشان داد که عصاره الکلی حاصل، کروماتوگرام های حاصل از آن ترکیب ۶-جینجرول را در عصاره اتانولی شناسایی کرد. این نتیجه می تواند بیانگر این مسئله باشد که استخراج با حلال الکلی روش مناسبی برای بدست آوردن متابولیت های مهم

بیان ژن های *DCC* و *TGFBR2* در زمان ۲۴ ساعت

همان طور که در شکل ۷ مشاهده می شود بعد از ۲۴ ساعت از شروع تیمار بیان ژن *DCC* در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره زنجبیل افزایش بیان بسیار زیادی داشت، این افزایش به میزان ۲۶٪ از نظر آماری معنی دار بود. در بیان ژن *DCC* در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره زنجبیل نیز افزایش ۶/۰۷٪ دیده شد که از نظر آماری معنی دار بود. بیان ژن *TGFBR2* پس از گذشت ۲۴ ساعت تیمار سلول های سرطانی با عصاره زنجبیل در غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر افزایش ۲۴/۳۹٪ دیده شد و از نظر آماری معنی دار

موجود در گیاه زنجبیل است. طبق گزارش Malmir و همکاران (۲۰۲۰) استخراج با حلال الکلی روش بهتری برای بدست آوردن متابولیت‌های مهم موجود در گیاه زنجبیل است.



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره کامل اتانولی زنجبیل روی بیان ژن‌های *TGFBR2* و *DCC*

β -Actin پس از ۲۴ ساعت از شروع تست MTT

Figure 7. Effects of ethanol complete extract concentrations of *Zingiber officinale* on expression of *TGFBR2*, *DCC*, and β -Actin genes, 24 hours after start of MTT test

آنتی‌اکسیدانی انواع زنجبیل در شمال‌شرق هند پرداختند، آنان نیز اتانول را بهترین حلال برای استخراج حداکثر مقدار فنول (۰/۹۶ میلی‌گرم در گرم) و فلاونوئید (۱/۵۲ میلی‌گرم در گرم) در ریزوم خشک زنجبیل دانستند و بیان کردند که اندازه کوچک ریزوم‌های تازه باعث خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری در آنها شده است. در این مطالعه استفاده از عصاره اتانولی زنجبیل در آزمون MTT بر روی سلول‌های سرطانی *HCT-116* مشخص شد که این عصاره با $IC_{50}=300\mu g/ml$ در دو تیمار ۱۶ و ۲۴ ساعت از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. مطالعات مشابهی در این زمینه وجود دارد که عصاره اتانولی گیاهان می‌توانند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کنند (Panahi Kokhdan et al., 2021). طبق بررسی‌های Bondarian و همکاران (۲۰۱۹)، عصاره آبی چای سفید با غلظت‌های مختلف (۱۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و تغییرات سطح بیان ژن در خانواده‌های سرکوب‌کننده تومور (*P53*, *TGFBR2* و

طبق گزارش Gholizadeh و همکاران (۲۰۲۱) آنالیز خون موش‌های دارای سرطان پستان که به آنها عصاره اتانولی زنجبیل تزریق شده بود نشان داد که عصاره اتانولی زنجبیل بر روی ژن‌های *P53* و *APC* که سرکوب‌کننده تومور بودند و ژن *B-catenin* که آنکوژن می‌باشد اثر کاملاً مطلوب داشت که با نتایج تأثیر داروهای شیمیایی بر روی این ژن‌ها مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای که Tohma و همکاران (۲۰۱۶) خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و اتانولی زنجبیل را بررسی کردند، بیان نمودند که عصاره‌های مختلف زنجبیل خواص آنتی‌اکسیدانی متفاوتی داشته و خواص آنتی‌اکسیدانی به حلال عصاره‌گیری وابسته است. در مطالعه دیگری که توسط Sepahpour و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد مشخص گردید که حلال الکلی ۸۰٪ برای برگ‌کاری، زنجبیل و لیمو بهتر از استون ۸۰٪ است. بازه دمایی در خواص آنتی‌اکسیدانی مؤثر است. Shukla و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی خواص

اما پس از ۲۴ ساعت اثر افزایشی و معنی‌داری در بیان ژن‌های بازدارنده تومور داشته است. این اثر برای هر دو غلظت کلیدی ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شده است. بنابراین به نظر می‌رسد برای بدست آمدن نتیجه مطلوب و ثابت زمان ۲۴ ساعت لازم و ضروریست. در مجموع، این تحقیق بیانگر اثر القای ژن‌های بازدارنده تومور عصاره زنجبیل در سرطان روده بزرگ رده سلولی *HCT-116* می‌باشد. از این رو، می‌توان تحقیقات گسترده‌ای در محیط *in vivo* برای اثبات این موضوع انجام داد.

سپاسگزاری

در پایان، جا دارد از آقای دکتر فریدون بنداریان و دکتر مجید قلی‌بیگیان برای کمک‌های بی‌دریغشان در تمام طول اجرای پروژه تشکر و قدردانی کنیم.

References

- Bondarian, F., Ebrahimi, A., Mahjoubi, F., Majidi Herve, E. and Azadi Gonbad, R., 2019. Evaluation of phytochemical content of white tea clone 100 and changes the expression of tumor suppressor genes on colorectal cancer cell line HCT116. *Journal of Pharmacognosy Research*, 11(3): 224-229.
- Cafino, E.J.V., Marcelina, B.L. and Marfori, E.C., 2016. A simple HPLC method for the analysis of [6]-gingerol produced by multiple shoot culture of ginger (*Zingiber officinale*). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(1): 38-42.
- Duman-scheel, M., 2009. Netrin and DCC: axon guidance regulators at the intersection of nervous system development and cancer. *Current Drug Targets*, 10(7): 602-610.
- Farahani, H., Hamta, A. and Zolvanari, A., 2013. Laboratory evaluation of cytotoxic effects of *Zingiber officinale* on breast cancer using some methods (Chemofx assay) and comparing the pattern of x-ray diffraction of healthy and cancerous DNA. *Research, Technology-Arak University-Faculty of Basic Sciences*: <http://ganj.irandoc.ac.ir/articles/658924>.
- Finney, D.J., 1952. *Probit analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. Cambridge University Press, 256p.
- Gholizadeh, A.R.P., Ebrahimi, A. and Rahei, M., 2021. Effect ginger extract on 4T1 breast cancer in Balb/c mouse. *Clinical Cancer Drugs*, 8(1): 43-49.

DCC افزایش یافته است که با تحقیقات ما همخوانی دارد. *DCC* باعث توسعه سیستم عصبی در ارتباط با سرطان می‌شود که معمولاً کاهش بیان *DCC* با بسیاری از انواع سرطان نوروبلاست‌ها، بدخیمی‌های خونی و سرطان‌های معده، پروستات، تخمدان، مری، پستان و بیضه مرتبط است (Duman-Scheel, 2009). طبق نتایج Bondarian و همکاران (۲۰۱۹) نتایج بیان ژن *DCC*, *P53* و *TGFBR2* به‌عنوان ۳ ژن مهم در مسیر سیگنالینگ در خانواده سرکوب‌کننده تومور نشان داد که هر ۳ ژن در تیمار ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره آبی چای سفید در زمان ۲۴ ساعت دارای بالاترین افزایش بیان نسبت به نمونه کنترل بوده است که با نتایج ما همخوانی داشت. Qi و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که تیمار عصاره زنجبیل در دو غلظت ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان ۱۶ ساعت در سلول‌های سرطانی *SW480* روده بزرگ بر روی بیان دو ژن *P53* و *BCL-2* اثر مثبت افزایشی در سطح معنی‌داری ۵٪ داشته است. شاگول موجود در عصاره زنجبیل به همراه ۶-جینجرول بر روی چرخه سلولی و تقسیم سلولی تأثیرگذارند و از طریق دو پروتئین *cdc-2* و *cdc-25A* بر روی فاز *G2* چرخه سلولی اثر می‌گذارند. افزایش بیان این دو ژن سبب افزایش بیان دو ژن *SMAD3* و *TGF-β* نیز می‌شود. بررسی *TGFBR2* در روی سرطان کلورکتال نشان داد که گیرنده‌های *TGFBR2* یک مسیر سیگنال تشکیل می‌دهند که رونویسی بسیاری از ژن‌ها را تنظیم و به‌عنوان یک سرکوب‌کننده تومور و یک سیستم ایمنی عمل می‌کنند. بنابراین غیرفعال کردن ژن *TGFBR2* یا ژن *BAX* ممکن است به پیشرفت تومور کمک کند (Shima et al., 2011).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که بیان ژن‌های *TGFBR2* و *DCC* در دو آزمایش در طی ۱۶ و ۲۴ ساعت، در سلول‌های سرطانی بدون تیمار و سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره زنجبیل با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این موضوع را نشان داد که رفتار ژن‌های بازدارنده تومور در ۱۶ ساعت پس از اعمال تیمار زنجبیل متغیر بوده و نتیجه مناسبی نشان نداده است.

- Sepahpour, S., Selamat, J., Abdul Manap, M.Y., Khatib, A. and Abdull Razis, A.F., 2018. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2): 402.
- Shima, K., Morikawa, T., Yamauchi, M., Kuchiba, A., Imamura, Y., Xiaoyun, L., Meyerhardt, J.A., Charles S.F. and Ogino, S., 2011. TGFBR2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers. *PLoS One*, 6(9): e25062.
- Shukla, A., Goud, V.V. and Das, C., 2019. Antioxidant potential and nutritional compositions of selected ginger varieties found in Northeast India. *Industrial Crops and Products*, 128: 167-176.
- Sivalokanathan, S., Ilayaraja, M. and Balasubramanian, M.P., 2006. Antioxidant activity of *Terminalia arjuna* bark extract on N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 281: 87-93.
- Spiess, A.N. and Neumeyer, N., 2010. An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacology*, 10(1): 6.
- Tchombe, L., Louajri, A. and Benajiba, M.H., 2012. Therapeutic effects of ginger (*Zingiber officinale*). *ISESCO Journal of Science and Technology*, 8(14): 64-69.
- Tohma, H., Gülçin, I., Bursal, E., Gören, A.C., Alwasel, S.H. and Köksal, E., 2016. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11: 556-566.
- Heydari, N. and Faraji, M., 2014. Ethanolic ginger extract on body weight and breast cancer tumor growth in mice BALB/C. *Journal of Animal Sciences (Iranian Journal of Biology)*, 27(4): 487-497.
- Jung, Y.D. and Ellis, L.M., 2001. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *International Journal of Experimental Pathology*, 82(6): 309-316.
- Malmir, Sh., Ebrahimi, A. and Mahjoubi, F., 2020. Effect of ginger extracts on colorectal cancer HCT-116 cell line in the expression of MMP-2 and KRAS. *Gene Reports*, 21: 100824.
- Martín, M., Simon-Assmann, P., Keding, M., Martín, M., Mangeat, P., Real, R. and Fabre, M., 2006. DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *European Journal of Cell Biology*, 85(8): 769-783.
- Noori Dalooi, M.R. and Abdollahzadeh, R., 2014. Role of p53 in apoptosis and cancer therapy. *Journal of the Internal Medicine Today*, 20(3): 191-201.
- Panahi Kokhdan, E., Sadeghi, H., Danaei, N. and Sadeghi, H., 2021. Cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Stachys setifera* on MCF-7 human breast cancer cell line. *Armaghan-e-danesh*, 26(1): 33-44.
- Prasad, S. and Tyagi, A.K., 2015. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *Hindawi*, 2015: 142979.
- Radhakrishnan, E.K., Smitha, B.V., Narayanan, Nath, S.S., Thulasidasan, L.A., Eppurathu Vasudevan, A.K.T. and Ruby John, A., 2014. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. *PLoS One*, 9(8): e104401.
- Sebaugh, J.L., 2011. Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2): 128-134.

Study on 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) complete extract and its molecular effects on *HTC-116* colorectal cancer cell line

T. Soleimani¹, A. Ebrahimi^{2*}, F. Mahjoubi³ and M. Sadeghi³

1- Ph.D. student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: dr.asaebrahimi@gmail.com

3- Department of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Karaj, Iran

Received: December 2021

Revised: June 2022

Accepted: June 2022

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) is a spicy medicinal plant with antioxidant, antitumor, and anticancer properties. The present study was conducted to evaluate the effects of ethanol extract of fresh ginger rhizome on inhibiting *HCT-116* colon cancer cells and the expression of *TGFBR2* and *DDC* genes as tumor suppressor genes and β -*Actin* gene as reference gene. HPLC analysis was used to identify and measure the amount of 6-gingerol in the extract. Toxicity of different concentrations of the complete extract (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) on the *HCT-116* cell line was investigated using the MTT test, 16 and 24 hours after the start of the test (at 16 and 24). The expression of *TGFBR2*, *DCC*, and β -*Actin* genes was assessed by RT-PCR after treatment with concentrations of 150 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of the complete extract at 16 and 24 hours. The amount of 6-gingerol was obtained 86.2 ± 2.03 mg per 100 g dry weight of ginger ethanol extract powder based on the HPLC results. The MTT test results showed that IC_{50} was 80.44 at 16 h and 473.19 at 24 h. Cell mortality was significantly increased at concentrations of 150 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of the extract. Also, expression of the *TGFBR2* and *DCC* genes increased at 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ at both 24 and 16 hours significantly ($P < 0.01$). The present research proved the ginger extract effect on tumor inhibitory genes induction in *HCT-116* colon cancer cell line.

Keywords: Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.), 6-gingerol, Colorectal cancer, HCT-116 cell line.