DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x
مقاله پژوهشی

بررسی اثر۶-شگول بر بیان ژن های *Insig1* و *FASN* در رده ی سلولی سرطان خون لفنوبلاستی حاد Nalm-6

سمیه نجفی درچه و سهیلا رهگذر*

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۴

چکیده

سرطان خون لنفوبلاستی حاد (ALL: Acute lymphoblastic leukemia) شایع‌ترین سرطان در میان کودکان است. تیم تحقیقاتی ما با بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc.) بر سلول‌های ALL نشان داد، زنجبیل دارای اثر ضدسرطانی قوی در این سلول‌ها می‌باشد. ۶-شگول به عنوان یکی از مشتقات فعال زنجبیل با اثر بر میزان بیان ژن-های دخیل در چرخه‌سلولی و آپوپتوز سبب ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر ۶-شگول بر میزان بیان *FASN* (*Fatty acid synthase*)، از طریق افزایش بیان ژن *Insig1* (*Insulin induced gene 1*) در سلول‌های سرطانی ALL، بمنظور یافتن مسیرهای مولکولی مرتبط با این مشتق دارویی می‌باشد. در این مطالعه رده‌های سلولی Nalm-6، RN95، CCRF-CEM و R-CCRF-CEM با غلظت‌های افزایشی ۶-شگول تیمار شدند. درصد زنده‌مانی با روش MTT و میزان مرگ سلولی با روش رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی شدند. اثر ۶-شگول بر میزان بیان ژن‌های *FASN* و *Insig1* با استفاده از تکنیک real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد ۶-شگول به طور معنی‌داری سبب کاهش درصد زنده‌مانی رده‌های سلولی Nalm-6، RN95 و R-CCRF-CEM می‌شود. این اثر مهاری در رده‌های سلولی R-CCRF-CEM و Nalm-6 نسبت به رده سلولی CCRF-CEM بیشتر بود. اضافه بر این، ۶-شگول به طور معنی‌داری سبب کاهش بیان ژن *FASN* می-شود درحالی‌که اثر معنی‌داری بر میزان بیان نسبی ژن *Insig1* نشان نداد، بنابراین ممکن است این مشتق دارویی اثر ضد سرطانی خود را با تأثیر بر سایر مسیرهای مولکولی القا کند.

واژه های کلیدی: سرطان خون لنفوبلاستی حاد، عصاره زنجبیل(*Zingiber officinale* Rosc.)، ۶-شگول، ژن *FASN*، ژن *Insig1*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۲۴۵۷ ، پست الکترونیکی: rahgozar@sci.ui.ac.ir

مقدمه

سرطان خون لنفوبلاستی حاد (ALL: Acute lymphoblastic leukemia) شایع ترین بدخیمی در بین کودکان بوده که از سلول های پیش ساز رده لنفوسیتی B یا T نشأت گرفته و با درنظر گرفتن خصوصیات مورفولوژیک و ایمونوفنوتایپی به دو نوع اصلی B-ALL و T-ALL تقسیم می شود (۱۶).

استفاده از داروهای شیمی درمانی به عنوان روش معمول درمان سرطان، سبب بروز عوارض جانبی بسیاری مانند کاهش تعداد سلول های خونی و پلاکت ها، تهوع، استفراغ، اسهال، ریزش مو و مهار سیستم ایمنی می شود (۱۳). گیاهان دارویی به صورت منفرد و یا در ترکیب با داروهای شیمی درمانی سبب افزایش اثرات ضدسرطانی این داروها و کاهش عوارض

Proof Article

DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x مقاله پژوهشی

جانبی ناشی از استفاده از این داروها می شوند. گیاهان دارویی با اثر بر مسیرهای مولکولی متفاوت، به طور همزمان بر فازهای مختلف بیماری تأثیر می گذارند (۲۰). علاوه بر خاصیت ضد سرطانی، گیاهان دارویی دارای خواص ضد التهابی (۱۱) و آنتی اکسیدانی (۲۲) نیز می باشند.

زنجبیل یکی از گیاهان دارویی است که در درمان بیماری های بسیاری از جمله، سرطان، بیماری های قلبی-عروقی، دیابت و رفع حالت تهوع و استفراغ مورد استفاده قرار می گیرد (۷ و ۱۴ و ۱۹ و ۲۶). مطالعات نشان می دهند زنجبیل و مشتقات آن دارای اثر ضد سرطانی در سرطان های کلون، پوست، کبد، تخمدان، معده و سینه می باشند (۷). مطالعات پیشین تیم تحقیقاتی ما نشان داد عصاره زنجبیل دارای اثر سیتوتوکسیک بر رده های سلولی ALL و سلول های بدخیم کودکان مبتلا به ALL است (۵). علاوه بر این بررسی اثر ۱۰-جینجرول، از دیگر مشتقات فعال زنجبیل، بر رده های سلولی ALL نشان داد این مشتق دارویی با کاهش درصد زنده مانی و القای آپوپتوز سبب اثرات سیتوتوکسیک می شود (۳).

مطالعات نشان می دهند در میان انواع مشتقات شگول، از ترکیبات فعال زنجبیل، ۶-شگول، دارای اثر ضد سرطانی قوی تری در انواع سرطان هاست (۱۵ و ۲۳). ۶-شگول با اثر بر مسیرهای مولکولی متفاوتی همچون PI3K، NFκB، JAK/STAT، MAPK، Notch1 و PPARγ سبب مهار رشد و تکثیرسلول های سرطانی می شود (۱۸ و ۲۴ و ۲۵). ۶-شگول به عنوان لیگاند سبب فعال شدن PPARγ و درنتیجه افزایش بیان ژن های تحت تنظیم این فاکتور رونویسی از جمله ژن *Insig1* (*Insulin induced gene 1*) می شود (۲۴). Insig1 با اتصال به پروتئین SCAP (SREBP activating protein) سبب مهار پردازش و در نتیجه ممانعت از فعالیت فاکتور رونویسی SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c) می شود (۹). از آن جایی که SREBP-1c یکی از فاکتورهای رونویسی ژن فتی اسید سنتاز (*FASN, Fatty acid synthase*) است، با افزایش بیان insig1، میزان بیان ژن *FASN* کاهش می یابد. فتی اسید سنتاز (FASN)، یک آنزیم کلیدی در تولید پالمیتات، در سلول های سرطانی افزایش بیان یافته و سبب رشد و تکثیر بیشتر و مهار آپوپتوز در این سلول ها می شود. براساس مطالعات قبلی تیم تحقیقاتی ما ژن *FASN* در سلول های سرطانی ALL افزایش بیان یافته و تیمار با عصاره زنجبیل سبب کاهش بیان این آنزیم در سلول های ALL می شود (۱۰).

در این پژوهش پس از بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر رده های سلولی ALL و انتخاب حساس ترین رده سلولی، بمنظور یافتن مکانیسم مولکولی مرتبط با این مشتق دارویی، اثر ۶-شگول بر میزان بیان ژن های *FASN* و *Insig1* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

رده های سلولی

رده های سلولی CCRF-CEM (از نوع T-ALL) و Nalm-6 (از نوع B-ALL) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. رده های سلولی R-CCRF-CEM (رده سلولی T-ALL مقاوم به داروی شیمی درمانی متوترکسات) و RN95 (رده سلولی B-ALL مقاوم به داروی شیمی درمانی سایتارابین) توسط تیم تحقیقاتی ما در دانشگاه اصفهان تولید شدند. شماره ثبت اختراع این رده ها، در سازمان ثبت اسناد و املاک کشور به ترتیب ۹۸۸۲۴ و ۱۰۰۲۸۱ می باشند.

سلول ها در محیط کشت کامل RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین – استرپتومایسین کشت داده شدند. محیط کشت کامل برای رده سلولی Nalm-6 حاوی ۱ درصد ال گلوتامین و برای R-CCRF-CEM حاوی ۱/۲ میکرومولار متوترکسات نیز بود.

تیمار رده های سلولی با غلظت های مختلف ۶-شگول

تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS کشت داده شدند. بمنظور بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول، سلول ها با ۵۰ میکرولیتر غلظت های افزایشی ۶-شگول (Adooq, Irvine, CA) تیمار شدند. سلول های گروه کنترل با DMSOی ۰/۴ درصد (به عنوان حلال ۶-شگول) تیمار شدند. پلیت ها متناسب با زمان دو برابر شدن رده های سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد و سپس درصد زنده مانی سلول ها با روش MTT سنجیده شد. آزمایش ها ۳ بار انجام شدند و نمونه ها در هر آزمایش به صورت ۳ بار تکرار تیمار شدند.

سنجش میزان زنده مانی با روش MTT

بمنظور تعیین میزان زنده مانی سلول ها از روش MTT (Atocel; Graz, Austria) استفاده می شود. در این روش پس از پایان زمان انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر) به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و پلیت کشت سلولی به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس محلول رویی حذف شده و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO، بلورهای به وجود آمده در کف هر چاهک حل شدند. جذب نوری هر چاهک با استفاده از یک دستگاه پلیت ریدر و در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

بررسی درصد مرگ سلولی با تریپان بلو

پس از تیمار سلول ها با مشتق دارویی ۶-شگول، حجم برابری از تریپان بلو (Sigma, Munich, Germany) و سوسپانسیون سلولی را پیپت کرده و پس از ۱ الی ۲ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط بر روی لام نئوبار شمارش شدند. به دلیل خاصیت نفوذپذیری انتخابی غشای پلاسمایی سلول و از آن جایی که تریپان بلو دارای بار منفی است، این رنگ نمی تواند از غشای سلول های سالم عبور نمی کند، در حالی که در سلول های مرده، رنگ به راحتی وارد سلول می شود. بنابراین در این روش سلول های سالم در زیر میکروسکوپ، بدون رنگ و سلول های مرده آبی رنگ می باشند. پس از شمارش سلول های زنده و کل سلول ها (زنده و مرده)، درصد زنده مانی تعیین شد.

بررسی اثر ۶-شگول بر میزان بیان ژن با روش real-time PCR

استخراج RNA کل، حذف DNA ژنومی و ساخت cDNA بترتیب با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen, Carlsbad, CA) و کیت تاکارا (Shiga, Japan)، مطابق با دستورالعمل های شرکت سازنده، انجام شدند. بیان ژن با استفاده از کیت سایبر گرین (Ampliqon RealQ Plus Master Mix Green high ROX™ , Copenhagen, Denmark) مورد بررسی قرار گرفت. هر آزمایش ۲ بار انجام شد و در هر آزمایش نمونه ها به صورت ۳ بار تکرار بودند. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Preproof Article

در جدول ۱ قابل مشاهده است. در این آزمایش از *GAPDH* به عنوان ژن خانه گردان استفاده شد. از روش $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه میزان بیان نسبی استفاده شد.

جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده برای ژن های مورد نظر

ژن	توالی آغازگر (5' → 3')	طول آغازگر (جفت باز)	طول محصول (جفت باز)	*دمای ذوب*	درصدGC
Insig1	F:AATGTCACTCTCTTCCCC GAGGAGG	۲۵	۱۱۱	۶۵/۳۶	۵۶
	R:ACAGGGGTACAGTAGGC CAACAACAG	۲۶		۶۶/۲۴	۵۳/۸۵
FASN	F:CCGCTTCCGAGATTCCAT CCTACGC	۲۵	۱۳۷	۶۷/۱۳	۶۰
	R:GGATGGCAGTCAGGCTC ACAAACG	۲۴		۶۶/۱۹	۵۸/۳
GAPDH	F:GCCCCAGCAAGAGCACA AGAGGAAGA	۲۶	۱۰۶	۶۸/۶۴	۵۷/۶۹
	R:CATGGCAACTGTGAGGA GGGGAGATT	۲۶		۶۶/۳۸	۵۳/۸۵

تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism 6، انجام شد. نتایج به دست آمده به صورت میانگین تکرار ها و با شاخص آماری انحراف معیار SEM، گزارش شده اند. گروه ها با کمک آزمون یک طرفه ANOVA و t-test مورد بررسی قرار گرفتند. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنادار بین گروه های مورد بررسی در نظر گرفته شد. حروف a تا e در شکل های ۱، ۲ و۴، بترتیب نشان دهنده ارتباط معنی دار با گروه کنترل و غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار ۶-شگول می باشند. حرف a در شکل ۳ نشان دهنده ارتباط معنی دار ستون های خاکستری رنگ (رده های سلولی R-CCRF-CEM یا Nalm-6) با ستون های مشکی رنگ (رده سلولی CCRF-CEM) است.

نتایج

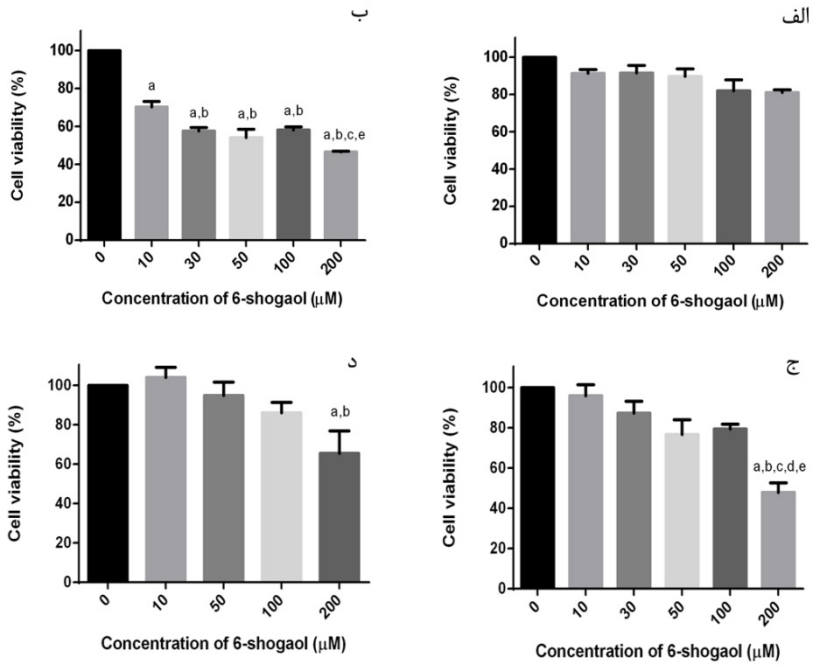
بررسی اثر ۶-شگول بر رده های سلولی ALL

پس از تیمار رده های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 با غلظت های افزایشی ۶-شگول، درصد زنده مانی سلول ها با روش آزمون MTT محاسبه شد. نتایج حاکی از اثر سیتوتوکسیک مشتق دارویی ۶-شگول در غلظت های بالا بر رده های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 بود. از آن جایی که ایمنوفنوتایپ B-ALL، با نرخ

Proof Article

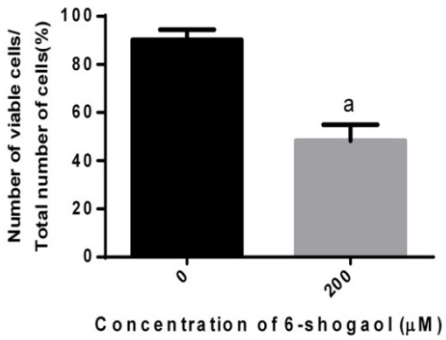
DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x

۸۵ درصد از کل ALL ها در میان کودکان، شایع تر است (۱۶) و رده سلولی Nalm-6 در غلظت های بالای ۶-شگول بیشترین حساسیت را نشان داد، این رده برای ادامه پژوهش انتخاب شد. علاوه بر این غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول نیز برای ادامه کار درنظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر رده های سلولی ALL. $۱۰^۴ \times ۲$ سلول با غلظت های افزایشی ۶-شگول و یا DMSO ی ۰/۴ درصد (به عنوان حلال ۶-شگول) تیمار شدند و میزان درصد زنده مانی با آزمون MTT بررسی شد. نمودارهای الف تا د بترتیب مربوط به رده های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 می باشند. ۶-شگول در غلظت های بالا سبب کاهش زنده مانی رده های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 شد. غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول، بیشترین اثر سیتوتوکسیک را بر رده سلولی Nalm-6 نشان داد.

بمنظور تایید نتایج به دست آمده از آزمون MTT، میزان مرگ سلول های Nalm-6 تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول، با تریپان بلو نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با این روش نیز نشان داد، ۶-شگول سبب افزایش میزان مرگ سلول های Nalm-6 می شود (شکل ۲).

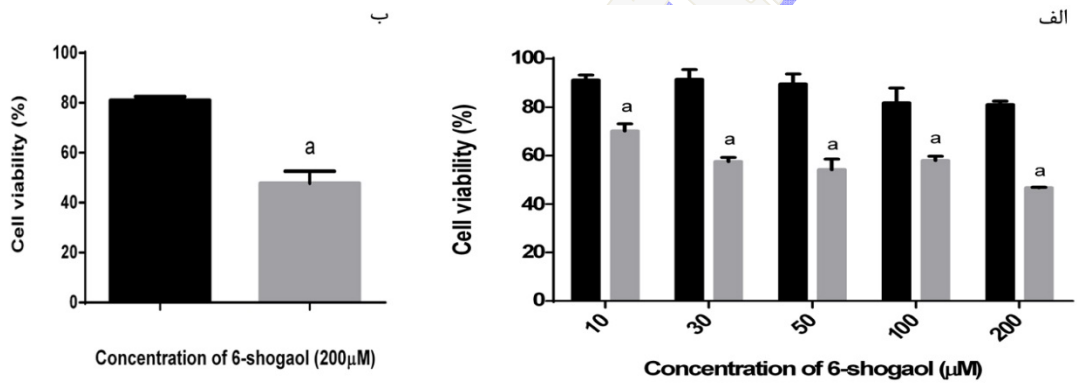


DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x مقاله پژوهشی

شکل ۲- بررسی میزان زنده مانی سلول های Nalm-6 متعاقب تیمار با ۶-شگول با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو. غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول سبب کاهش درصد زنده مانی سلول های Nalm-6 می شود.

مقایسه اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر زنده مانی رده های سلولی ALL

مقایسه میزان اثر مهاری ۶-شگول در رده های سلولی ALL نشان داد، ۶-شگول اثر سیتوتوکسیک بیشتری بر رده سلولی R-CCRF-CEM نسبت به رده سلولی CCRF-CEM داشت (شکل ۳-الف). اضافه بر این، غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول اثر مهاری بیشتری بر زنده مانی رده سلولی Nalm-6 نسبت به رده سلولی CCRF-CEM نشان داد (شکل ۳-ب).

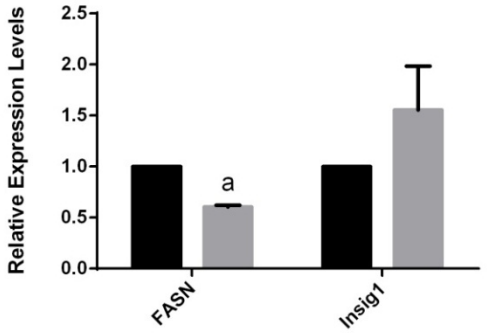


شکل ۳- مقایسه اثر ۶-شگول بر زنده مانی رده های سلولی ALL. الف) مقایسه میزان زنده مانی رده ی سلولی CCRF-CEM (ستون مشکی رنگ) و رده سلولی R-CCRF-CEM (ستون خاکستری رنگ) تحت تیمار با غلظت های مختلف ۶-شگول، نشان دهنده اثر سیتوتوکسیک قوی تر ۶-شگول بر رده ی مقاوم بود. ب) غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول، اثر سیتوتوکسیک قوی تری بر رده سلولی Nalm-6 (ستون خاکستری رنگ) نسبت به رده ی سلولی CCRF-CEM (ستون مشکی رنگ) نشان داد.

بررسی اثر ۶-شگول بر میزان بیان ژن های *FASN* و *Insig1*

بمنظور تعیین ژن های هدف احتمالی ۶-شگول، سلول های Nalm-6 با غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول تیمار شدند. سپس RNA کل استخراج و پس از سنتز cDNA از سلول های گروه کنترل و تیمار، میزان بیان ژن های *FASN* و *Insig1* با استفاده از روش real-time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد ۶-شگول سبب کاهش معنی دار بیان ژن *FASN* در سلول های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل می شود. در حالی که افزایش سطح بیان ژن *Insig1* در گروه تیمار با ۶-شگول نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود (شکل ۴).

DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x
مقاله پژوهشی



شکل ۴- مقایسه پروفایل بیانی ژن های *FASN* و *Insig1* در سلول های تیمار شده با ۶-شگول در مقایسه با گروه کنترل. سلول های Nalm-6 با غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول تیمار شده و پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA، میزان بیان به وسیله real-time PCR بررسی شد.

بحث

با وجودی که استفاده از داروهای شیمی درمانی اثربخشی بالایی را در درمان سرطان نشان می دهد، این داروها سلول های طبیعی بدن را نیز تحت تاثیر قرار داده و بنابراین سبب بروز عوارض جانبی بسیاری می شوند (۲۱). مطالعات نشان می دهد گیاهان دارویی سبب کاهش بقا و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی معده و کلون می شوند (۱ و ۲). زنجبیل به عنوان یکی از گیاهان دارویی که اثر ضد سرطانی آن در انواع مختلفی از سرطان ها به اثبات رسیده است، دارای ترکیبات متنوعی می باشد. در این مطالعه اثر ۶-شگول بر سلول های ALL و تاثیر این مشتق دارویی بر میزان بیان ژن *FASN* از طریق افزایش بیان ژن *Insig1* برای اولین بار، مورد بررسی قرار گرفت.

در پژوهش حاضر بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر رده های سلولی ALL، نشان داد ۶-شگول در غلظت های بالا سبب مهار زنده مانی رده های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 می شود (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی میزان مرگ سلولی با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو نیز با نتایج حاصل از آزمون MTT همخوانی داشت (شکل ۲). در مطالعات قبلی نیز اثر مهاری ۶-شگول بر زنده مانی رده های سلولی سرطان های ریه، کلون و پروستات، به اثبات رسیده است (۱۵ و ۲۳).

در این مطالعه مشخص شد اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر رده سلولی R-CCRF-CEM نسبت به رده سلولی CCRF-CEM بیشتر است (شکل ۳-الف). یکی از مکانیسم هایی که در رده سلولی R-CCRF-CEM می تواند سبب مقاومت دارویی شود، افزایش بیان MDR1 می باشد. بررسی میزان بیان ژن های مرتبط با مقاومت دارویی در سلول های بدخیم بیماران مبتلا به ALL، حاکی از افزایش بیان ژن *MDR1* در بیماران mrd+ و درنتیجه انتقال رو به خارج دارو از سلول و مقاومت دارویی است (۱۷). از آن جایی که *MDR1* یکی از اهداف فاکتور رونویسی NF-κB می باشد (۶). و پژوهش ها نشان می دهد ۶-شگول سبب مهار فعالیت NF-κB می شود، بنابراین ۶-شگول می تواند اثر مهاری خود را بر زنده مانی سلول های R-CCRF-CEM، از طریق این مسیر نیز ایفا کنند. لازم به ذکر است جهت اثبات ادعای ذکر شده، مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

Preproof Article

اضافه بر این، در این مطالعه نشان داده شد اثر سیتوتوکسیک غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول بر رده سلولی Nalm-6 از CCRF-CEM بیشتر می باشد (شکل ۳-ب). با توجه به این که ژن *p53* در رده سلولی CCRF-CEM به صورت جهش یافته می باشد (۸). بنابراین فعالیت مشتق دارویی ۶-شگول از طریق مسیر پیام رسانی p53 در این رده سلولی مهار می شود. علاوه بر این، مطالعات نشان می دهد، میزان بیان ژن *STAT3* به طور معنی داری در بیماران B-ALL نسبت به بیماران T-ALL بیشتر است (۴). از آن جایی که ۶-شگول مهارکننده STAT3 می باشد (۲۵)، ممکن است اثر سیتوتوکسیک قوی تر ۶-شگول بر رده سلولی Nalm-6 نسبت به رده سلولی CCRF-CEM به علت فعالیت بیشتر مسیر STAT3 در رده Nalm-6 باشد. جهت اثبات این ادعا نیز مطالعات و تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

در این پژوهش مشخص شد، ۶-شگول سبب کاهش میزان بیان ژن *FASN* در سلول های Nalm-6 می شود (شکل ۴). بررسی میزان بیان آنزیم FASN در سلول های بدخیم کودکان مبتلا به ALL، نشان می دهد، میزان بیان ژن *FASN* در بیماران ALL مقاوم به داروهای شیمی درمانی نسبت به سایر بیماران، افزایش می یابد. علاوه بر این، عصاره زنجبیل سبب کاهش میزان بیان ژن *FASN* در سلول های بدخیم بیماران مبتلا به ALL می شود. مطالعات داکینگ مولکولی حاکی از گرایش بالای مشتق دارویی ۶-شگول برای اتصال به دومین های تیوستراز و کتوسینتاز FASN و مهار فعالیت این آنزیم می باشد (۱۰).

به نظر می رسد با افزایش فعالیت PPARγ، به دنبال اتصال ۶-شگول (۲۴) بیان ژن *Insig1* در سلول سرطانی افزایش یابد (۱۲). Insig1 با اتصال به SCAP مانع از انتقال کمپلکس SCAP-SREBP-1c به گلژی و پردازش SREBP-1c می شود. بنابراین بیان ژن های تحت کنترل این فاکتور رونویسی، از جمله *FASN*، کاهش می یابد (۹ و ۱۲). علی رغم عدم اثبات رابطه بین بیان ژن *insig1* و *FASN* در این پژوهش، به نظر می رسد مطالعات تکمیلی در سطح اپی ژنتیکی و بررسی بیان ژن در سطح پروتئین بتواند در توجیه ارتباط بین این دو ژن و تفسیر مکانیسم اثر ۶- شگول در سرطان خون کمک کننده باشد.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد ۶-شگول دارای اثر سیتوتوکسیک بر رده های سلولی ALL می باشد. علاوه بر این مشخص شد این اثر می تواند ناشی از کاهش بیان ژن *FASN* باشد. FASN یکی از پروتئین های دخیل در رشد و تکثیر سلول های سرطانی است. علی رغم عدم اثبات فرضیه ی کاهش بیان ژن *FASN* متعاقب افزایش بیان ژن *insig1* در رده ی سلولی Nalm-6 متعاقب تیمار سلولی با ۶-شگول، این پژوهش اولین مطالعه در خصوص اثبات اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر سلول های لوسمیک خون می باشد. باتوجه به عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی و مهارکننده های غیرطبیعی FASN، این پژوهش با معرفی مشتق گیاهی ۶- شگول به عنوان یک گیاه دارویی موثر و کم خطردر درمان ALL و پیشنهاد استفاده از آن به عنوان یک داروی مکمل در پروتکل های درمانی، می تواند گام موثری در جهت درمان سرطان خون تلقی شود.

سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه اصفهان (به شماره ۹۷/۱۴۲۵۵) و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد (به شماره ۱۵/۲۵۱۷) انجام شده است.

Preproof Article

منابع مورد استفاده

۱- اربابی ، مرجان. حسن پور، حلیمه. عرب زاده، سمیه. مقامی، پروانه. (۱۳۹۹). اثر سینرژیک عصاره گیاه هندوانه ابوجهل(Citrullus colocynthis) و فیکوسیانین بر القای مرگ برنامه ریزی شده در دودمان سلولی سرطان کولون انسانی(HT-29). مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۳۳ (۲)، ۲۸۶-۲۷۸.

۲- میمندی، کتایون. یعقوبی، محمد مهدی. (۱۳۹۴). اثرات عصاره آبی و اتانولی گل محمدی (Rosa damascena mill L.) بر علیه سلول‌های سرطانی معده انسان. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۲)، ۳۰۹-۲۹۹.

۳- نجفی درچه, سمیه. رهگذر, سهیلا. طالعی, داریوش. قدوسی, الهه السادات. (۱۴۰۰). بررسی اثر سیتوتوکسیک ۱۰- جینجرول، از مشتقات گیاه دارویی زنجبیل (Zingiber officinale Roscoe)، بر رده‌های سلولی سرطان خون لنفوبلاستی حاد. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۷ (۱)، ۱۲-۱.

4- Adamaki M, Tsotra M, Vlahopoulos S, Zampogiannis A, Papavassiliou AG, Moschovi M (2015). STAT transcript levels in childhood acute lymphoblastic leukemia: STAT1 and STAT3 transcript correlations. Leukemia research, 39 (11): 1285-91.

5- Babasheikhali SR, Rahgozar S, Mohammadi M (2019). Ginger extract has anti-leukemia and anti-drug resistant effects on malignant cells. Journal of cancer research and clinical oncology, 145(8):1987-98.

6- Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, et al (2003). NF-κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. Oncogene, 22(1):90-7.

7- Butt MS, Sultan MT (2011). Ginger and its health claims: molecular aspects. Critical reviews in food science and nutrition, 51(5):383-93.

8- Geley S, Hartmann BL, Hattmannstorfer R, Löffler M, Ausserlechner MJ, Bernhard D, et al (1997). p53-induced apoptosis in the human T-ALL cell line CCRF-CEM. Oncogene,15(20):2429-37.

9- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006). Protein sensors for membrane sterols. Cell, 124(1): 35-46.

10- Ghaeidamini MH, Rahgozar S, Rahimi SB, Safavi A, Ghodousi ES (2020). Fatty acid synthase, a novel poor prognostic factor for acute lymphoblastic leukemia which can be targeted by ginger extract. Scientific reports, 10(1):1-13.

11- Grzanna R, Lindmark L & Frondoza CG (2005). Ginger—an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. Journal of medicinal food, 8(2): 125-132.

12- König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, et al (2009). Activation of PPARα and PPARγ reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. European journal of pharmacology, 605 (1-3): 23-30.

Preprint Article

13- Krishnan V, Rajasekaran A (2014). Clinical nanomedicine: a solution to the chemotherapy conundrum in pediatric leukemia therapy. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 95(2):168-78.

14- Kumar G, Karthik L, Rao KB (2011). A review on pharmacological and phytochemical properties of Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae). Journal of Pharmacy Research, 4(9):2963-6.

15- Liu C-M, Kao C-L, Tseng Y-T, Lo Y-C, Chen C-Y (2017). Ginger phytochemicals inhibit cell growth and modulate drug resistance factors in docetaxel resistant prostate cancer cell. Molecules, 22(9):1477.

16- Pieters R, Carroll WL (2008). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Clinics of North America, 55(1):1-20.

17- Rahgozar S, Moafi A, Abedi M, Entezar-E-Ghaem M, Moshtaghian J, Ghaedi K, et al (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(1):35-41.

18- Ray A, Vasudevan S, Sengupta S (2015). 6-Shogaol inhibits breast cancer cells and stem cell-like spheroids by modulation of Notch signaling pathway and induction of autophagic cell death. PloS one, 10(9):e0137614.

19- Rehman R, Akram M, Akhtar N, Jabeen Q, Shah SA, Ahmed K, et al (2011). Zingiber officinale Roscoe (pharmacological activity). Journal of Medicinal Plants Research, 5 (3).

20- Safarzadeh E, Shotorbani SS, Baradaran B (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Advanced pharmaceutical bulletin, 4(Suppl 1):421.

21- Sak K (2012). Chemotherapy and dietary phytochemical agents. Chemotherapy research and practice, 2012.

22- Sanei M, Ghasemnezhad A, Sadeghi Mahounak A, Masoumi M & Ghorbani Kh (2021). Screen of Antioxidant Activity Leads to Recognition of High Valuable Medicinal Plants: A Case Study of Paveh and Ormanat, West of Iran. Journal of Genetic Resources, 7(1): 87-105.

23- Sang S, Hong J, Wu H, Liu J, Yang CS, Pan M-H, et al (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 (22): 10645-50.

24- Tan BS, Kang O, Mai CW, Tiong KH, Khoo AS-B, Pichika MR, et al (2013). 6-Shogaol inhibits breast and colon cancer cell proliferation through activation of peroxisomal proliferator activated receptor γ (PPARγ). Cancer letters, 336(1):127-39.

25- Weng CJ, Chou CP, Ho CT, Yen GC (2012). Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. Molecular nutrition & food research, 56(8):1304-14.

26- White B (2007). Ginger: an overview. American family physician, 75(11):1689-91.

Preprint Article

DOR: xx.xxxx.xxxxxxxx.xx.x.x.x.x
مقاله پژوهشی

Evaluation of the effect of 6-shogaol on the expression of *FASN* and *Insig1* genes in the acute lymphoblastic leukemia cell line Nalm-6

Running Title: The effect of 6-shogaol on the expression of *FASN and Insig1* genes in Nalm-6

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer among children. Our previous study on the cytotoxic effect of ginger extract (*Zingiber officinale* Rosc.) demonstrated the anti-leukemic effects of ginger extract on ALL cells. 6-Shogaol, the most active derivative of ginger extract, inhibits the growth and proliferation of cancer cells, by affecting the expression of genes involved in the cell cycle and apoptosis. The purpose of this study was to investigate the effect of 6-shogaol on the expression of *FASN* (*Fatty acid synthase*) via *Insig1(Insulin induced gene 1)* gene over expression, in acute lymphoblastic leukemia cells, in order to find the molecular pathways related to this drug derivative. CCRF-CEM, R-CCRF-CEM, Nalm-6 and RN95 were treated with increasing concentrations of 6-shogaol .The cell viability was determined using MTT assay and the rate of cell death was assessed by trypan blue staining assay. The mRNA expression levels of *FASN* and *Insig1* genes were evaluated using real-time PCR. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 software. Results presented 6-shogaol significantly decrease R-CCRF-CEM, Nalm-6 and RN95 cells viability. This inhibitory effect was greater in R-CCRF-CEM and Nalm-6 than in CCRF-CEM. Moreover, 6-shogaol reduces *FASN* expression significantly, but it did not show a significant effect on the expression of *Insig1*, so this drug derivative may induce its anti-cancer effect by affecting other molecular pathways.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, ginger extract (*Zingiber officinale* Rosc.), 6-shogaol, *FASN* gene, *Insig1* gene

Preprint Article