

بررسی اثر ۶-شگول بر بیان ژن‌های *INSIG1* و *FASN* در رده‌ی سلولی سرطان خون

لنفوبلاستی حاد Nalm-6

سمیه نجفی درچه و سهیلا رهگذر*

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی 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 عصاره زنجبیل (*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 ژن‌های دخیل در چرخه سلولی 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 مهارتی 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* می‌شود درحالی‌که اثر معنی‌داری بر میزان بیان نسبی ژن *Insig1* نشان نداد، بنابراین ممکن است این مشتق دارویی اثر ضدسرطانی خود را با تأثیر بر سایر مسیرهای مولکولی القا کند.

واژه‌های 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

کاهش تعداد سلول‌های خونی و پلاکت‌ها، تهوع، استفراغ، اسهال، ریزش مو و مهار سیستم ایمنی می‌شود (۱۳). گیاهان دارویی به صورت منفرد و یا در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی سبب افزایش اثرات ضدسرطانی این داروها و کاهش عوارض جانبی ناشی از استفاده از این داروها می‌شوند. گیاهان دارویی با اثر بر مسیرهای مولکولی متفاوت، به طور همزمان بر فازهای مختلف بیماری تأثیر می‌گذارند (۲۰). علاوه بر خاصیت ضد

سرطان خون لنفوبلاستی حاد (ALL: Acute lymphoblastic leukemia) شایع‌ترین بدخیمی در بین کودکان بوده که از سلول‌های پیش‌ساز رده لنفوسیتی B یا T نشأت گرفته و با در نظر گرفتن خصوصیات مورفولوژیک و ایمونوفنوتایپی به دو نوع اصلی B-ALL و T-ALL تقسیم می‌شود (۱۶).

استفاده از داروهای شیمی‌درمانی به عنوان روش معمول درمان سرطان، سبب بروز عوارض جانبی بسیاری مانند

سرطانی، گیاهان دارویی دارای خواص ضد التهابی (۱۱) و آنتی‌اکسیدانی (۲۲) نیز می‌باشند.

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

مطالعات نشان می‌دهند 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، MAPK، JAK/STAT، Notch1 و PPARγ سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۸ و ۲۴ و ۲۵). ۶-شگول به عنوان لیگاند سبب فعال شدن PPARγ و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های تحت تنظیم این فاکتور رونویسی از جمله ژن *Insig1* (*Insulin induced gene 1*) می‌شود (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) می‌شود (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 می‌یابد. 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 سلول‌ها می‌شود. براساس مطالعات قبلی تیم تحقیقاتی ما ژن *FASN* در سلول‌های سرطانی ALL افزایش بیان یافته و تیمار با عصاره زنجبیل سبب کاهش بیان این آنزیم در سلول‌های ALL می‌شود (۱۰).

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

مواد و روشها

رده‌های سلولی: رده‌های سلولی CCRF-CEM (از نوع T-ALL) و Nalm-6 (از نوع B-ALL) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. رده‌های سلولی R-CCRF-CEM (رده سلولی T-ALL مقاوم به داروی شیمی‌درمانی متوترکسات) و RN95 (رده سلولی B-ALL مقاوم به داروی شیمی‌درمانی سائتارابین) توسط تیم تحقیقاتی ما در دانشگاه اصفهان تولید شدند. شماره ثبت اختراع این رده‌ها، در سازمان ثبت اسناد و املاک کشور به ترتیب ۹۸۸۲۴ و ۱۰۰۲۸۱ می‌باشند.

سلول‌ها در محیط کشت کامل RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد FBS (*Fetal bovine serum*) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین کشت داده شدند. محیط کشت کامل برای رده سلولی Nalm-6 حاوی ۱ درصد آل‌گلوتامین و برای R-CCRF-CEM حاوی ۱/۲ میکرومولار متوترکسات نیز بود.

تیمار رده‌های سلولی با غلظت‌های مختلف ۶-شگول: تعداد $10^4 \times 2$ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS کشت داده شدند. بمنظور بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول، سلول‌ها با ۵۰ میکرولیتر غلظت‌های افزایشی ۶-شگول (Adooq, Irvine,)

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 نمی‌تواند از غشای سلول‌های سالم عبور نمی‌کند، در حالی که در سلول‌های مرده، رنگ به راحتی وارد سلول می‌شود. بنابراین در این روش سلول‌های سالم در زیر میکروسکوپ، بدون رنگ و سلول‌های مرده آبی رنگ می‌باشند. پس از شمارش سلول‌های زنده و کل سلول‌ها (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 تراپزول (Invitrogen, Carlsbad, CA) و کیت تاکارا (Shiga, Japan)، مطابق با دستورالعمل‌های 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 نمونه‌ها به صورت ۳ بار تکرار بودند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ قابل مشاهده است.

CA تیمار شدند. سلول‌های گروه کنترل با DMSO ۰/۴ درصد (به عنوان حلال ۶-شگول) تیمار شدند. پلیت‌ها متناسب با زمان دو برابر شدن رده‌های سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد قرار داده شد و سپس درصد زنده مانی سلول‌ها با روش MTT سنجیده شد. آزمایش‌ها ۳ بار انجام شدند و نمونه‌ها در هر آزمایش به صورت ۳ بار تکرار تیمار شدند.

سنجش میزان زنده مانی با روش MTT: بمنظور تعیین میزان زنده مانی سلول‌ها از روش MTT (Atocel; Graz, Austria) استفاده می‌شود. در این روش پس از پایان زمان انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و پلیت کشت سلولی به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 سلول‌ها با مشتق دارویی ۶-شگول، حجم برابری از تریپان بلو (Sigma, Munich, Germany) و سوسپانسیون سلولی را

جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های مورد نظر

ژن	(5' → 3') توالی آغازگر	طول آغازگر (جفت باز)	طول محصول (جفت باز)	دمای ذوب	درصد GC
<i>Insig1</i>	F:AATGTCACCTCTCTCCCCGA GGAGG	۲۵	۱۱۱	۶۵/۳۶	۵۶
	R:ACAGGGGTACAGTAGGCCA ACAACAG	۲۶		۶۶/۲۴	۵۳/۸۵
<i>FASN</i>	F:CCGCTTCCGAGATTCATCC TACGC	۲۵	۱۳۷	۶۷/۱۳	۶۰
	R:GGATGGCAGTCAGGCTCAC AAACG	۲۴		۶۶/۱۹	۵۸/۳
<i>GAPDH</i>	F:GCCCCAGCAAGAGCACAAG AGGAAGA	۲۶	۱۰۶	۶۸/۶۴	۵۷/۶۹
	R:CATGGCAACTGTGAGGAGG GGAGATT	۲۶		۶۶/۳۸	۵۳/۸۵

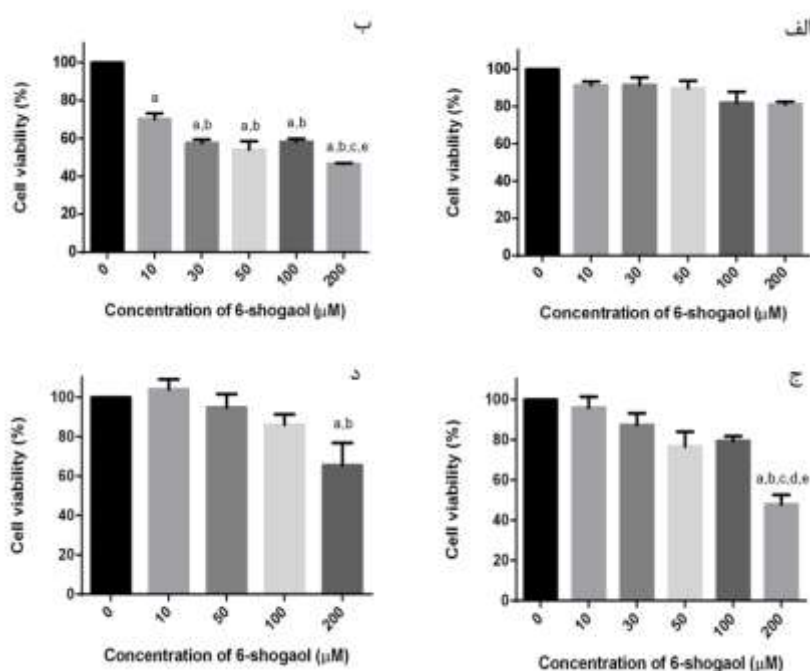
نتایج

بررسی اثر ۶-شگول بر رده‌های سلولی ALL

پس از تیمار رده‌های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 با غلظت‌های افزایشی ۶-شگول، درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش آزمون MTT محاسبه شد. نتایج حاکی از اثر سیتوتوکسیک مشتق دارویی ۶-شگول در غلظت‌های بالا بر رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 بود. از آن جایی که ایمنونوتایپ B-ALL، با نرخ ۸۵ درصد از کل ALL‌ها در میان کودکان، شایع‌تر است (۱۶) و رده سلولی Nalm-6 در غلظت‌های 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 در نظر گرفته شد (شکل ۱).

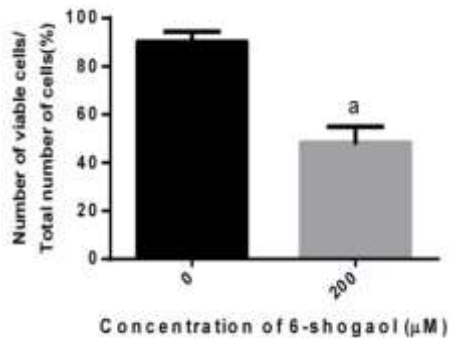
در این آزمایش از *GAPDH* به عنوان ژن خانه گردان استفاده شد. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه میزان بیان نسبی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 انجام شد. نتایج به دست آمده به صورت میانگین تکرارها و با شاخص آماری انحراف معیار SEM، گزارش شده‌اند. گروه‌ها با کمک آزمون یک طرفه ANOVA و t-test مورد بررسی قرار گرفتند. *P* کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنادار بین گروه‌های مورد بررسی در نظر گرفته شد. حروف a تا e در شکل‌های ۱، ۲ و ۴، بترتیب نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار با گروه کنترل و غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار ۶-شگول می‌باشند. حرف a در شکل ۳ نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار ستون‌های خاکستری رنگ (رده‌های سلولی R-CCRF-CEM یا Nalm-6) با ستون‌های مشکی رنگ (رده سلولی CCRF-CEM) است.

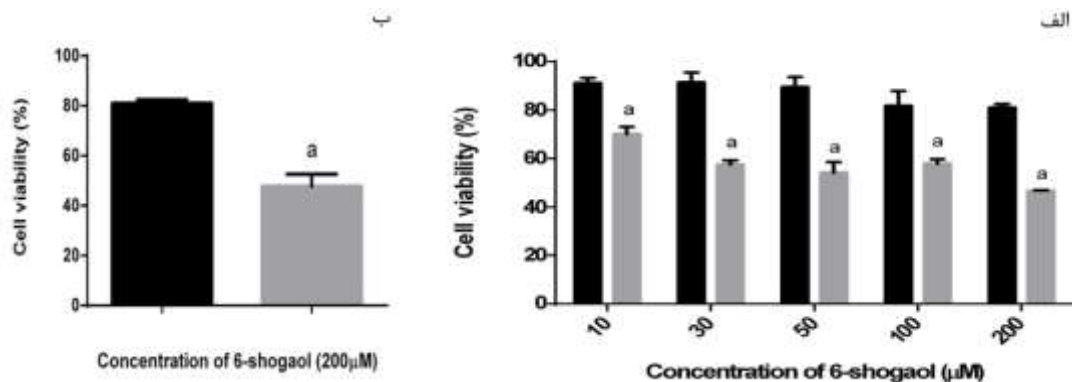


شکل ۱- بررسی اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر رده‌های سلولی ALL $10^4 \times 2$ سلول با غلظت‌های افزایشی ۶-شگول و یا DMSO ۰/۴ درصد (به عنوان حلال ۶-شگول) تیمار شدند و میزان درصد زنده‌مانی با آزمون MTT بررسی شد. نمودارهای الف تا د بترتیب مربوط به رده‌های سلولی CCRF-CEM، R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 می‌باشند. ۶-شگول در غلظت‌های بالا سبب کاهش زنده‌مانی رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 شد. غلظت ۲۰۰ میکرومولار ۶-شگول، بیشترین اثر سیتوتوکسیک را بر رده سلولی Nalm-6 نشان داد.

بیشتری بر زنده مانی رده سلولی Nalm-6 نسبت به رده سلولی CCRF-CEM نشان داد (شکل ۳-ب).



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 می‌شود.



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.

گروه کنترل می‌شود. در حالی که افزایش سطح بیان ژن *Insig1* در گروه تیمار با ۶-شگول نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود (شکل ۴).

بحث

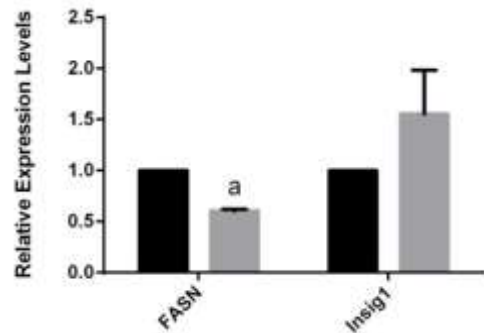
با وجودی که استفاده از داروهای شیمی درمانی اثربخشی بالایی را در درمان سرطان نشان می‌دهد، این داروها سلول های طبیعی بدن را نیز تحت تاثیر قرار داده و بنابراین سبب

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 می‌شود (شکل ۲).

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

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

بروز عوارض جانبی بسیاری می‌شوند (۲۱).



شکل ۴- مقایسه پروفایل بیانی ژن‌های *FASN* و *Insig1* در سلول‌های تیمار شده با ۶-شگول در مقایسه با گروه کنترل. سلول‌های 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.

مطالعات نشان می‌دهد گیاهان دارویی سبب کاهش بقا و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده و کلون می‌شوند (۱ و ۲). زنجبیل به عنوان یکی از گیاهان دارویی که اثر ضد سرطانی آن در انواع مختلفی از سرطان‌ها به اثبات رسیده است، دارای ترکیبات متنوعی می‌باشد. در این مطالعه اثر ۶-شگول بر سلول‌های 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 رده‌های سلولی ALL، نشان داد ۶-شگول در غلظت‌های بالا سبب مهار زنده‌مانی رده‌های سلولی R-CCRF-CEM، Nalm-6 و RN95 می‌شود (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 زنده‌مانی رده‌های سلولی سرطان‌های 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 مکانیسم‌هایی

که در رده سلولی R-CCRF-CEM می‌تواند سبب مقاومت دارویی شود، افزایش بیان *MDR1* می‌باشد. بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی در سلول‌های بدخیم بیماران مبتلا به ALL، حاکی از افزایش بیان ژن *MDR1* در بیماران mrd+ و در نتیجه انتقال رو به خارج دارو از سلول و مقاومت دارویی است (۱۷). از آنجایی که *MDR1* یکی از اهداف فاکتور رونویسی NF-κB می‌باشد (۶). و پژوهش‌ها نشان می‌دهد ۶-شگول سبب مهار فعالیت NF-κB می‌شود، بنابراین ۶-شگول می‌تواند اثر مهاری خود را بر زنده‌مانی سلول‌های R-CCRF-CEM، از طریق این مسیر نیز ایفا کند. لازم به ذکر است جهت اثبات ادعای ذکر شده، مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

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 می‌باشد (شکل ۳-ب). با توجه به این که ژن *p53* در رده سلولی CCRF-CEM به صورت جهش یافته می‌باشد (۸). بنابراین فعالیت مشتق دارویی ۶-شگول از طریق مسیر پیام‌رسانی *p53* در این رده سلولی مهار می‌شود. علاوه بر این، مطالعات نشان می‌دهد، میزان بیان ژن *STAT3* به طور معنی‌داری در بیماران B-ALL نسبت به بیماران T-ALL بیشتر است (۴). از آنجایی که ۶-شگول مهارکننده *STAT3* می‌باشد (۲۵)، ممکن است اثر سیتوتوکسیک قوی‌تر 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 سلول‌های Nalm-6 می‌شود (شکل ۴). بررسی میزان بیان آنزیم *FASN* در سلول‌های بدخیم کودکان مبتلا به ALL، نشان می‌دهد، میزان بیان ژن *FASN* در بیماران ALL مقاوم به داروهای شیمی‌درمانی نسبت به

این مشخص شد این اثر می‌تواند ناشی از کاهش بیان ژن *FASN* باشد. *FASN* یکی از پروتئین‌های دخیل در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی است. علی‌رغم عدم اثبات فرضیه‌ی کاهش بیان ژن *FASN* متعاقب افزایش بیان ژن *insig1* در رده‌ی سلولی Nalm-6 متعاقب تیمار سلولی با ۶-شگول، این پژوهش اولین مطالعه در خصوص اثبات اثر سیتوتوکسیک ۶-شگول بر سلول‌های لوسمیک خون می‌باشد. با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی و مهارکننده‌های غیرطبیعی *FASN*، این پژوهش با معرفی مشتق گیاهی ۶-شگول به عنوان یک گیاه دارویی موثر و کم‌خطر در درمان *ALL* و پیشنهاد استفاده از آن به عنوان یک داروی مکمل در پروتکل‌های درمانی، می‌تواند گام موثری در جهت درمان سرطان خون تلقی شود.

سیاسگزاری

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.

سایر بیماران، افزایش می‌یابد. علاوه بر این، عصاره زنجبیل سبب کاهش میزان بیان ژن *FASN* در سلول‌های بدخیم بیماران مبتلا به *ALL* می‌شود. مطالعات داکینگ مولکولی حاکی از گرایش بالای مشتق دارویی ۶-شگول برای اتصال به دومین‌های تیوستراز و کتوسینتاز *FASN* و مهار فعالیت این آنزیم می‌باشد (۱۰).

به نظر می‌رسد با افزایش فعالیت $PPAR\gamma$ ، 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* می‌شود. بنابراین بیان ژن‌های تحت کنترل این فاکتور رونویسی، از جمله *FASN*، کاهش می‌یابد (۹ و ۱۲). علی‌رغم عدم اثبات رابطه بین بیان ژن *insig1* و *FASN* در این پژوهش، به نظر می‌رسد مطالعات تکمیلی در سطح اپی‌ژنتیکی و بررسی بیان ژن در سطح پروتئین بتواند در توجیه ارتباط بین این دو ژن و تفسیر مکانیسم اثر ۶-شگول در سرطان خون کمک‌کننده باشد.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد ۶-شگول دارای اثر سیتوتوکسیک بر رده‌های سلولی *ALL* می‌باشد. علاوه بر

منابع

۱- سلول‌های سرطانی معده انسان. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸ (۲)، ۲۹۹-۳۰۹.

۲- 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)، ۱-۱۲.

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 برنامه‌ریزی شده در دودمان سلولی سرطان کولون انسانی (*HT-29*). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۳ (۲)، ۲۷۸-۲۸۶.

۲- میمندی، کتایون. یعقوبی، محمد مهدی. (۱۳۹۴). اثرات عصاره آبی و اتانولی گل محمدی (*Rosa damascena mill L*) بر علیه

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 PPAR α and PPAR γ reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. *European journal of pharmacology*, 605 (1-3): 23-30.
- 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 (PPAR γ). *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.

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

leukemia cell line Nalm-6

Najafi Dorcheh S. and Rahgozar S.*

Dept. of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

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