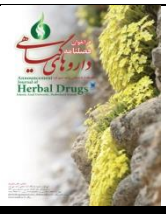


فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.jhd.iaushk.ac.ir

مقایسه اثر عصاره زنجبیل و آسپیرین بر بیان ژن COX-2 در سلول های دودمان سرطان کولون HT-29

آرزو حقیقی[۱] ، نوشا ضیا جهرمی[۲*]

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛

۲. استادیارگروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛

** مسئول مکاتبات (**E-mail: Noosha 59 @yahoo.com**)*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۱۰

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: فیتوشیمی

- *کلید واژگان :*
- *HT-29*
- *زنجبیل*
- *سرطان کولون*
- *COX-2*
- *آسپیرین*

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان کولون پس از سرطان ریه دومین علل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می باشد. عوامل محیطی و ژنتیکی نقش مهمی در بروز این سرطان ایفا می کنند. از عوامل مهم در ایجاد این سرطان التهابات طولانی مدت کولون می باشد. زنجبیل به دلیل داشتن ترکیب ۶-جینجرول دارای خاصیت ضد التهابی است که در پیشگیری از سرطان کولون نقش دارد. در سرطان کولون التهاب، از علائم اولیه آن محسوب می شود. در این مطالعه اثر عصاره زنجبیل بر بیان ژن COX-2 در سلول‌های دودمان سرطان کولون HT-29 بررسی شد.

روش تحقیق: در این مطالعه، سلول‌های دودمان سرطان کولون HT-29 پس از کشت، در پاساژ سوم تریپسینه شد و تعداد ۵۰۰۰ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس سلول‌ها با عصاره زنجبیل در ۴ غلظت۱۰، ۲۰، ۳۰ و۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تیمار داده و پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 انکوبه گردید. به منظور بررسی تاثیر عصاره زنجبیل بر سلول ها، تست MTT انجام و دانسیته نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. RNAتوتال سلولی استخراج و توسط روش RT-PCR بیان ژن COX-2 بررسی گردید.

نتایج و بحث: عصاره زنجبیل با غلظت ۲۰ میلی گرم برمیلی‌لیتر بیشترین IC50 را نشان داد. بیان ژن COX-2 با روش RT-PCR نشان داد، عصاره زنجبیل با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر موجب کاهش بیان ژن COX-2 در مقایسه با داروی آسپرین به عنوان یک داروی ضد التهاب درسلول‌های دودمان HT-29 سرطان کولون می‌شود. باتوجه به اهمیت کاهش التهاب در بیماران مبتلا به سرطان کولون یافته‌ها نشان داد که استفاده از عصاره زنجبیل می‌تواند نقش مهمی در کاهش التهاب و کاهش بیان ژن COX-2 که نقش مهمی در سنتز پروستاگلاندین‌ها و ایجاد التهاب دارد داشته باشد.

توصیه کاربردی/صنعتی: در این بررسی نقش عصاره زنجبیل و آسپیرین که از داروهای ضدالتهاب موثر است قابل مقایسه بوده‌است. لذا به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، بتوان از آن به عنوان یک راهکار جدید درمانی بهره برد.

۱. مقدمه

سرطان کولون پس از سرطان ریه دومین علل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان (Leong, 1998) و پس از سرطان معده و مری، سومین سرطان شایع گوارشی در ایران است (Mohebbi, 2008). سرطان کولون بیماری است که در آن، سلول های بدخیم در بافت روده بزرگ ایجاد می شوند. عوامل متعددی در ایجاد و گسترش سرطان روده بزرگ دخالت دارد نظیر سن، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی افراد، سیگار کشیدن، کم تحرکی، مصرف الکل و چاقی (Garland, 1980). در این بیماری التهاب، نقش مهمی داشته که علت ایجاد آن تولید مقادیر زیاد آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ و فعال شدن مسیر تولید پروستاگلاندین ها می باشد. این التهابات در ایجاد پولیپ های روده ای نقش مهمی دارند. در صورتیکه این پولیپ ها به موقع برداشته نشوند، تبدیل به تومورهای سرطانی بدخیم می‌شوند (Brenner, 2014). در کنار همه این عوامل از نقش فاکتورهای ژنتیکی در گسترش و ایجاد التهاب و در نتیجه بدخیمی‌های روده بزرگ نمی‌توان چشم پوشی کرد. یکی از این فاکتورها ژن COX-2 (سیکلو اکسیژناز-۲) می‌باشد. آنزیم سیکلواکسیژناز توسط ژن COX-2 تولید می شود. در پستانداران دو ایزوفرم از این آنزیم، به نام‌های COX-1و COX-2 (سیکلو اکسیژناز۱و۲) با ژن های مستقل و الگوی بیان متفاوت وجود دارد. COX-2 به عنوان جزئی از واکنش های التهابی در پاسخ به تحریکات خارج سلولی سریعا القاء می گردد و میزان آن در اغلب بافت های طبیعی غیر قابل سنجش می‌باشد (Kujubut, 1991; Xie, 1991).

مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیکی حاکی از کاهش خطر ایجاد تومورهای بدخیم کولون در اثر مصرف منظم داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی مثل آسپرین و سالینداک می باشند که از طریق مهار سنتز پروستاگلاندین ها باعث کاهش التهاب در این بیماری می شود. بنابراین مهار ژن COX-2 به عنوان یک استراتژی امیدبخش و مؤثر برای درمان و جلوگیری از سرطان کولون مورد توجه قرار گرفته است (Hla, 1999). افرادی که به طور منظم از آسپیرین یا دیگر داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی استفاده می‌کنند ۴۰ تا ۵۰ درصد کمتر به سرطان کولون مبتلا می شوند. همچنین مطالعاتی که روی مدل‌های حیوانی انجام شده نشان می دهد که مصرف داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد تومورها می شود.

طی سال‌های اخیر گیاه زنجبیل به عنوان یک گیاه دارویی مورد توجه گرفته است. زنجبیل به عنوان دارو، ادویه و خوراک لذیذ در دنیا استفاده می گردد. این گیاه به دلیل داشتن ترکیب ۶–جینجرول باعث کاهش التهابات و در نتیجه سرکوب سلول‌های سرطانی می شود و افراد را در برابر ابتلا به سرطان کولون و مرگ و میر ناشی از آن محافظت می کند (Geong, 2010; Brenner, 2014). لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره زنجبیل بر کاهش بیان ژن COX-2 در سلول‌های دودمان سرطان کولون HT-29 می باشد تا از نتایج این تحقیق بتوان در بحث درمان و پیشگیری سرطان روده بزرگ استفاده نمود.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. کشت سلول‌های رده HT-29 سرطان کولون

رده سلولی سرطان کولون HT-29 از انستیتو پاستور تهران (Cat. No. 30-2020) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتو مایسین تا رسیدن به فاز لگاریتمی در انکوباتور CO2 حاوی ۹۵ درصد هوا، ۵ درصد دی اکسیدکربن، رطوبت نسبی ۹۵ درصد و درجه حرارت ۳۷درجه سانتیگراد ، انکوبه شدند.

۲-۲. کشت سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه

سلول‌ها در پاساژ سوم تریپسینه شده، سپس تعداد ۵۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد.

۲-۳. تیمار سلول‌ها با عصاره زنجبیل

عصاره زنجبیل به صورت زنجبیل حاوی، ماده موثره جینجرول از شرکت Sigma با Cat. No. 17H26O4 خریداری شد و در ۴ غلظت ۱۰،۲۰،۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های هر پلیت اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد.

۲-۴. تست رنگ سنجی MTT

MTT (۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲ ایل) یک آزمون رنگ سنجی است که در آن رنگ زرد تترازولیوم زرد توسط آنزیمهای

میتوکندریایی به رنگ ارغوانی فورمازان تغییر می‌یابد. تعداد نسبی سلول‌های زنده ارتباط مستقیم با میزان جذب نور دارد. به طور خلاصه تعداد ۵۰۰۰ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه الایزا ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها، در دمای ۳۷ درجه هر چاهک با عصاره زنجبیل در ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر تیمار شده و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ماده MTT به سلول‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس محلول DMSO (دی متیل سولفوکسید) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

جذب نوری پلیت ها توسط الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر متر بررسی شد و نتایج به صورت IC50 بیان شد.

۲-۵. استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل

تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول HT-29 با مقدار IC50 عصاره زنجبیل جمع‌آوری گردید و جهت استخراج RNA از کیت Tripurer کمپانی Roch استفاده شد. به سلول‌ها ۱ میلی لیتر محلول Tripurer اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم به سلول‌ها اضافه شده و پس از مخلوط کردن سلول‌ها با اتانول ویال با دور ۷۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. نهایتا پس از اینکه سلول‌ها با ایزوپروپانل انکوبه شدند به رسوب RNA، ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حاوی DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) افزوده و ویال ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده، جذب نوری RNA توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۸۰ بررسی شد. برای ساخت cDNA از کیت Thermo SCIENTIFIC استفاده شد. به طور خلاصه ۱ میکروگرم از RNA با ۳ میکرولیتر پرایمر Reverse (پیشرو) و Forward(پسرو) مخلوط شد. مخلوط حاصل در دمای ۴۲ درجه به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به سرعت روی یخ قرار گرفت.

۲-۶. آزمون RT-PCR بیان ژن COX-2

پرایمرهای ژن COX-2 با استفاده از نرم افزار Gen runner طراحی و ساخته شدند.

محصولات PCR روی ژل ۱,۵ درصد آگارز به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه ها با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید. محصول تکثیر ژن COX-2 باند bp ۲۶۷ می باشد. از باندهای به دست آمده توسط دستگاه ترانس لومیناتور عکس برداری شد.

۳. نتایج و بحث

نتایج تست MTT برای سلول های HT-29 سرطان کولون در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره زنجبیل در زمان ۷۲ ساعت در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرها GAPDH و COX-2

Forward COX-2	5’-GTCTGATGATGTATGCCACAATCTG-3’
Revers COX-2	5’-GATGCCAGTGATAGAGGGTGTTAAA-3’
Forward GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
Revers GAPDH	3'- GAAGATGGTGATGGGATTTC- 5'

جدول ۲. واکنشگر های لازم جهت انجام RT-PCR

مواد	حجم
cDNA (۱ /۱۰۰۰)	۲ میکرو لیتر
PCR buffer 10X	۵ میکرولیتر
dNTP 10Mm	۱ میکرولیتر
Reverse and Forward COX-2 Primer	۳ میکرولیتر
Tag DNA Polymerase	۰/۵ میکرولیتر
25 mM$MgCl_2$	۳ میکرولیتر
Water nuclease free	۳۵/۵ میکرولیتر
Total volume	۵۰ میکرو لیتر

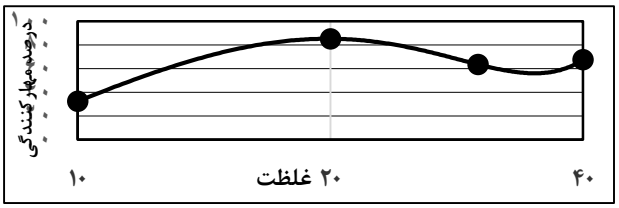
نتیجه تست MTT نشان داد که در عصاره زنجبیل با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به غلظت ۱۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر مهار کنندگی را بر سلول های HT-29 داشته است.

جـدول ۳. شـرایط دمـایی لازم بـرای انجـام RT_PCR (پرایمـر COX-2).

PCR initial denaturation step	۳ دقیقه	۹۴ درجه سانتی-گراد	۱ سیکل
Denaturation	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی-گراد	۳۵ سیکل
Annealing GAPDH Primer	۳۰ ثانیه	۵۹ درجه سانتی-گراد	
Extension	۴۵ ثانیه	۷۲درجه سانتی گراد	
Extension	۵ دقیقه	۷۲درجه سانتی گراد	۱ سیکل

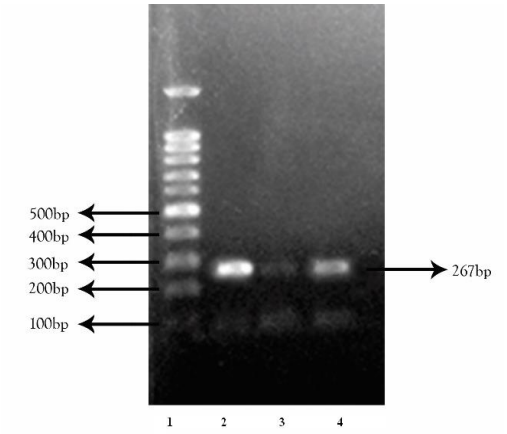
جدول ۴. ارزیابی MTT بر غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل (۷۲ساعت)

غلظت عصاره زنجبیل (میلی گرم بر میلی لیتر)	**۴۰**	**۳۰**	**۲۰**	**۱۰**
OD میانگین	۰/۱۵۹	۰/۱۶۰	۰/۰۵	۰/۱۹۲



شکل ۱. غلظت عصاره زنجبیل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در آزمون رنگ سنجی MTT.

نتایج به دست آمده نشان داد عصاره زنجبیل با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بیشترین مقدار IC50 را داشته و باعث کاهش بیان ژن COX-2 در سلول‌های HT-29 سرطان کولون می‌شود. در مقابل در سلول‌های HT-29 که با عصاره زنجبیل تیمار نشده بودند کاهش سطح بیان ژن COX-2 مشاهده نشد. بیان ژن COX-2 در سلول‌های گروه آزمون و کنترل در ساعات مختلف نشان داد که بهترین نتیجه در ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها به دست می‌آید (شکل ۲).



شکل ۲. چاهک شماره ۱: مارکر. چاهک شماره ۲: کنترل منفی. چاهک شماره ۳: رده سلولی HT-29 تیمار شده با عصاره آسپیرین. چاهک شماره ۴: رده سلولی HT-29 تیمار شده با عصاره زنجبیل.

مطالعات محققین نشان داده است که زنجبیل به دلیل داشتن ترکیب ۶-جینجرول دارای خاصیت ضدالتهابی است که در پیشگیری از سرطان کولون نقش دارد.

مطالعاتی که در سال ۱۹۹۳ و ۱۹۹۷ انجام شد نشان دهنده افزایش التهاب درسلول‌های روده افراد مبتلا به سرطان کولون بود (Giardielo, 1993; Shiff, 1997).

مطالعات ژنتیکی و فارماکولوژیکی Carlson و همکارانش (۲۰۰۳) نشان داد که در سرطان کولون بیان پروتئین pGf2 و COX-2 افزایش می‌یابد که خود باعث فعال شدن چند مسیر سیگنالینگ سلول و پیشرفت بیماری می‌شود (Carlson, 2003). Yang و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود اثر مصرف عصاره زنجبیل را به مدت ۲۸ روز بر روی سلول‌های سرطانی کولون بررسی کردند که مطابق با نتایج Kim و همکاران (۲۰۱۱) است (Yang, 2011).

با توجه به یافته های فوق و اهمیت افزایش بیان ژن COX-2 در التهابات، این فرضیه که احتمالا التهابات در کولون در نتیجه افزایش بیان این ژن به وجود می‌آید تایید می‌شود و این ژن برای کنترل پیشرفت بیماری ضرورت دارد.

در مطالعه حاضر بررسی بیان ژن COX-2 مد نظر قرار داده شد. بررسی بیان ژن COX-2 با تکنیک RT-PCR نشان داد که پس از تیمار سلول‌های HT-29 با عصاره زنجبیل روند کاهش بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد در صورتی که در سلول‌های شاهد این کاهش مشاهده نشد.

زنجبیل به دلیل داشتن ترکیب ۶- جینجرول باعث سرکوب التهاب در سلول‌های سرطانی می‌شود و افراد را در برابرابتلا به سرطان کولون و مرگ و میر ناشی از آن محافظت می‌کند. Zick و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر عصاره زنجبیل را روی رده سلولی HCT-115 بررسی کردند. آن‌ها این دودمان سلولی را با ۱ میلی‌گرم عصاره زنجبیل به مدت۷۲ ساعت انکوبه کردند. سپس میزان پروتئین‌های 5HETE(۵- هیدروکسی ایکوزانوئیک اسید)، 15HETE (۱۵- هیدروکسی ایکوزانوئیک اسید)، 13-HODE (۱۳- هیدروکسی دکانوئیک اسید)، 12-HETE (۲-هیدروکسی ایکوزانوئیک اسید) PGE2 (پروستاگلاندین -۲) سلول‌های افراد بیمار را با روش الایزا اندازه‌گیری کردند. آنها میزان آنزیم‌های PGE2 سنتاز-۱، ۵ لیپو اکسیژناز، PGE2 دهیدروژنازو سیکلو اکسیژناز-۲ موجود درپلاسمای ۲۶ فرد سالم و ۲۸ بیمار را با روش اسپکتروفتومتری سنجیدند و دریافتند که این آنزیم‌ها در پلاسمای خون افراد بیمار افزایش یافته است سپس به این نتیجه رسیدند که عصاره زنجبیل ژن التهابی COX-2 را مهار می کند و خطر ابتلا به سرطان کولون را کاهش می‌دهد.

نتایج تحقیقات Seong و همکاران نشان داد که ترکیب ۶- جینجرول باعث افزایش بیان NAG-1 که یک فاکتور سیکلین دخیل در آپاپتوز و خواص ضد توموری است، شده و در نتیجه باعث مهار بیان سیکلین D1 می شود. همچنین این ترکیب اثر مهاری بر-β catenin، PKCεو مسیر GSK-3β دارد.

نتایج حاصل از تست MTT در مطالعه حاضر نشان داد که پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار شدن سلول‌ها با عصاره زنجبیل، بهترین غلظت از عصاره زنجبیل که نیمی از سلول -ها در آن کشته شده بودند، غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. نتایج نشان دهنده اثر ضد التهابی عصاره زنجبیل از طریق مهار مسیر سنتز پروستاگلاندین ها و درنتجه کاهش تولید mRNA ژن COX-2 است. زنجبیل در مهار بیان ژن COX-2 و جلوگیری از ایجاد التهابات در سرطان کولون نقش بسزایی دارند.

۴. نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش انجام شده که بیانگر اثر ضد التهابی عصاره زنجبیل بر سلول‌های دودمان HT-29 سرطان کولون می باشد و همچنین قیمت مناسب و در دسترس بودن آن، به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر در آینده، بتوان از آن به عنوان یک راه کار جدید درمانی بهره برد.

۵. منابع

Berenda P, R. P., Rothenon, A . 2011. Effect of Aspirin on risk of colon cancer, LANCET. 11(12): 21-32.

Brenner K.M., Pox, CP3. 2014. Colorectal cancer. *Lancet*, 383 (9927): 1490-1502.

Carlson, M.L., Stephen, M . 2003. Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. *Molecular Cancer*, 2(3): 42-45.

Garland, C.F.1980. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer?. *Inter national Journal Epidemiol*, 9(7): 227-231.

Geong S. B., Jungil, H., Fosdick, C . 2010. Cyp 2c9 and uGt A6 Genotypes Modulate the Protective Effect of Gigerole on colon cancer. *Cancer Research*, 6(7): 62-66.

Giardielo, F.M., Krush, A. 1993. Treatmnt of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *New England Journal of Medical*, 328(28): 133–136.

Hampel, F. W., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P, et al. 2005. Screening for the Lynch syndrome(hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *New England Journal Medical*., 352(86) 185-186.

Hla, B. D., Liu, C.H., Schaefers, H.J., Trifan, O.C. 1999. Cyclooxygenase-1 and-2 isoenzymes. *IYBCB*, 31(45): 551-557.

Kim A, W. S., Willson, B. 2011. effect of Gingerole on colon cancer incidence and mortality. *Medical Scape*, 13(23): 51-76.

Kujubut, F. B., Varnum, B.C., Lim, R.W., Herschman, H.R. 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducilble mRNA from Swiss 3t3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *The Journal of Biological Chemistry*, 26(55): 126-187.

Mohebbi, M. M., Wolfe, R., Nourijelyani, K., Mohammad, K., Zeraati, H., et al. 2008.Geographical spread of gastrointestinal tract cancer incidence in the Caspian Sea region of Iran: spatial analysis of cancer registry data. *Bio Medical Centeral Cancer*, 8(18): 137-165

Xie, C. J., Robertson, DL., Erikson, RL., Simmous, D.L. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthease in regulated by mRNA splicing. Proceding of National Academy Science USA, 88(95): 2692-2696.

Seong-Ho LeeSeung Joon Baek Maria Cekanova. 2008. Multiple Mechanisms Are Involved in 6-Gingerol-Induced Cell Growth Arrest and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells, 47(3): 197–208.

Yang, J. H., Young, J. 2011. Increased Growth Inhibitory Effects on Human Cancer Cells and Anti-inflammatory Potency of Shogaols from Zingiber officinale Relative to Gingeroles. *Journal of Clinica Chimica Acta*, 14(26): 51-76.

Zick, S.M., Tugenen, P.K., Brenner, P.E. 2015. Effect of ginger root on eico sanoid in colon mucosa in people at normal risk for colorectal cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 5(6):12-14.