مقاله اصیل پژوهشی

مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان
۱۳۹۶: ۱۳(۲): ۱۱۵ تا ۱۲۴

بررسی اثر عصاره‌ی الکلی ریزوم‌های گیاه *Zingiber officinala* بر سلول‌های سرطان اسکواموس سل کارسینوم دهانی در مقایسه با رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش

زهرا گلستان‌نژاد[۱]
فائزه خزیمه[۲]
محسن دوست‌محمدی[۳]
شاهین گوانجی[۴]
محمدرضا گلستان‌نژاد[۵]
امیر معتمدی[۶]
فرناز فرهاد[۶]

۱: استادیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲: دانشیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳: کارشناس ارشد میکروبیولوژی سلولی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
۴: **نویسنده مسؤول:** باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. **Email:** shahin.gavanji@yahoo.com
۵: جراح و متخصص ارتوپدی، بیمارستان عیسی بن مریم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۶: دانشجوی دندان‌پزشکی، کمیته‌ی پژوهش‌های دانشجویی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی، جهت درمان بیماری‌های مختلفی همچون بدخیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به عدم انجام مطالعه‌ای در خصوص، بررسی اثر آنتی‌کارسینوژنی زنجبیل بر رده‌ی سلولی بدخیم اسکواموس سل کارسینومای دهانی تاکنون، در این مطالعه خاصیت ضد توموری این گیاه بر رده‌ی سلولی مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی- آزمایشگاهی در محیط in vitro، رده‌ی سلول‌های اسکواموس سل کارسینومای دهانی (KB) مورد آزمایش می‌باشد و رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) به عنوان شاهد در محیط کشت RPMI-1640 (SIGMA, USA) (Roswell Park Memorial Institute Medium) غنی شده رشد داده شدند. سپس عصاره‌ی ریزوم گیاه زنجبیل از مؤسسه‌ی تحقیقات طب سنتی و گیاهی ایران تهیه شد و سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زنجبیل (۰/۱ - ۷۶۸µg/ml) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مورد نظر، میزان زنده بودن سلول‌ها به روش MTT (methyl toluidine blue) تعیین گردید. سپس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ به روش ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش Tukey انجام شد.

یافته‌ها: میزان IC50 (غلظت مهار کننده ۵۰ درصد رشد سلولی) در این مطالعه، برای عصاره‌ی الکلی زنجبیل، روی هر دو رده‌ی سلولی KB و L929 به ترتیب برابر با ۱۴۸/۸۳ و ۳۵۸/۸۷ µg/ml بدست آمد. نسبت IC50 سلول نرمال به IC50 سلول توموری برابر با ۲/۴۱ = ۱۴۸/۸۳ ÷ ۳۵۸/۸۷ بدست آمد که نشان از نیاز به غلظت بالاتر عصاره‌ی زنجبیل به میزان تقریباً ۲/۵ برابر برای مشاهده‌ی میزان مشابه سیتوتوکسیسیتی سلول نرمال نسبت به سلول تومورال دارد. به عبارت دیگر بر اساس این نتایج، نشان داده شد که عصاره‌ی الکلی زنجبیل دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بیشتر بر سلول‌های توموری (KB) نسبت به سلول‌های نرمال (L929) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی الکلی تهیه شده از ریزوم زنجبیل، دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بر سلول‌های توموری اسکواموسسل کارسینوم دهانی می‌باشد و اثر سیتوتوکسیسیتی بیشتر بر سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های نرمال داشت.

کلید واژه‌ها: زنجبیل، کشندگی سلولی، سلول KB، اسکواموس سل کارسینوما.

تاریخ ارسال: ۹۵/۷/۱ **تاریخ اصلاح:** ۹۵/۱۰/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۵/۱۱/۱۲

استناد به مقاله: گلستان‌نژاد زهرا، خزیمه فائزه، دوست‌محمدی محسن، گوانجی شاهین، گلستان‌نژاد محمدرضا، معتمدی امین، فرهاد فرناز. بررسی اثر عصاره‌ی الکلی ریزوم‌های گیاه *Zingiber officinala* بر سلول‌های سرطان اسکواموس سل کارسینوم دهانی در مقایسه با رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۳۹۶؛ ۱۳(۲): ۱۱۵-۱۲۴.

مقدمه

بدخیمی با ۱۱ میلیون مرگ در هر روز، علت اصلی مرگ در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه است. اسکوآموس سل کارسینومای سر و گردن (HN SCC) ششمین کانسر شایع در جهان بوده (۱) و در هر سال تقریباً ۶۰۰ هزار مورد جدید از آن گزارش می‌شود (۲). رژیم‌های استاندارد درمان کارسینومای دهانی شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است (۳). عوارض جانبی رژیم‌های درمانی روتین شامل نروپاتی محیطی، ایجاد علایم گوارشی شامل اسهال، تهوع، استفراغ و یبوست (۴)، اختلال عملکرد نورولوژیک (۴)، آلوپسی (۵) و موکوزیت (۶) می‌باشد. درمان‌های استاندارد SCC (squamous cell carcinoma) دهانی در چهار دهه‌ی اخیر نتوانسته‌اند درصد زنده ماندن این بیماران را بهبود بخشند (۲) و همچنین استفاده از این درمان‌ها باعث بروز عوارض جانبی شدید حتی در بعضی موارد منجر به محدودیت ادامه‌ی درمان می‌گردد. با توجه به موارد مذکور، مطالعات روی مواد طبیعی به منظور دستیابی به ترکیباتی با خاصیت آنتی‌کانسری هدفمند (علیه سلول‌های توموری نه همه‌ی سلول‌های بدن) و پتانسیل سیتوتوکسیتی و عوارض جانبی کمتر صورت گرفته است (۷). در حال حاضر ترکیبات به دست آمده از گیاهان، به عنوان یکی از منابع مهم درمانی بدخیمی مطرح می‌باشند (۸). زنجبیل به‌طور وسیعی جهت درمان بیماری‌های مختلف در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد و در دنیا با نام Ginger مشهور بوده و از ریزوم‌های خشک شده‌ی گیاهی به نام Zingiberofficinala به دست می‌آید (۹). تاکنون مطالعات متعددی روی خاصیت ضد توموری زنجبیل صورت گرفته است. خواص آنتی‌کارسینوژنی این گیاه به ترکیبات موجود در آن شامل zingerone، shogaols، paradol، gingerol، vallinoids مرتبط می‌باشد (۱۰). در ریزوم گیاه زنجبیل، اولئورزینی موجود است که حاوی جینجرول (gingerol) می‌باشد. اثرات ترکیب gingerol بر سلول‌های توموری در مطالعات مختلف بررسی شده و نتایج نشان داده است که این ترکیب، دارای اثر مهاری و سیتوتوکسیسیتی بر سلول‌های بدخیم می‌باشد (۱۴-۱۱). gingerol با دو مکانیسم، یکی القای مسیر آپوپتوز و دیگری مهار آنژیوژنریس، عملکرد آنتی‌کارسینوژنیک خود را انجام می‌دهد (۹). از دیگر مکانیسم‌های مطرح در خاصیت آنتی‌کانسری زنجبیل، خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، تنظیم فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تغییر در بیان ژن‌ها، کاهش سنتز DNA و توقف سیکل سلولی در فاز G0/G1 توسط این گیاه می‌باشد (۱۷-۱۵). اثر آنتی‌کارسینوژنیک زنجبیل بر کانسر کبد، کولون، ریه و پستان در محیط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد، این گیاه دارای اثر کشندگی و مهار کنندگی رشد بر رده‌ی سلول‌های توموری مورد آزمایش بوده است (۹، ۲۰-۱۸). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، اثر عصاره‌ی الکلی زنجبیل بر سلول‌های سرطان پستان (MCF7) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از آن نشان داد، در غلظت ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵۰ درصد سلول‌های توموری از بین رفته‌اند، اما عصاره‌ی زنجبیل مورد آزمایش در آن طرح بر سلول‌های نرمال بی‌تأثیر بود (۱۹). مطالعه‌ی تانتیویچاپیکول و همکاران (۲۰) نشان داد، عصاره‌ی زنجبیل با مهار کردن دو ژن، کپی‌برداری تلومراز معکوس (hTERT) و c-Myc که فقط در سلول توموری کارسینوم ریه فعال شده، باعث کشندگی این سلول‌ها می‌شود، در حالی‌که بر سلول نرمال که ژن‌های مذکور غیر فعال هستند، بی‌تأثیر می‌باشد.

نکته‌ی قابل توجه این‌که زنجبیل، اثرات درمانی خود را با حداقل عوارض جانبی بر سلول‌های نرمال بدن نشان می‌دهد (۲۱). مقایسه‌ی اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره‌ی زنجبیل با متوتروکسات بر رده‌ی سلولی توموری پستان در مطالعهی فخری و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۱ نشان داد هر دو، اثر مهاری مشابهی بر سلول‌های بدخیم مورد مطالعه دارند، ولی عصاره‌ی زنجبیل برخلاف متوتروکسات، اثر کشندگی بسیار کمتری بر سلول‌های نرمال دارد، به‌طوری که غلظت مورد نیاز عصاره برای مهار سلول‌های نرمال ۵-۶ برابر غلظت آن

برای همان میزان مهار سلول‌های بدخیم بدست آمد. در سال ۲۰۱۰ توکل افشاری و همکاران (۲۳)، اثر عصاره‌ی الکلی زنجبیل بر سلول‌های سرطانی کبد (HepG2) را مورد بررسی قرار دادند که میزان IC50 آن برابر با ۲۵۰۰ µg/ml بدست آمد. بودی و دانگ (۲۴) در سال ۲۰۰۳، اثر gingerol را بر سلول‌های تومور کولون انسان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد ترکیب gingerol باعث مهار این رده‌ی سلولی توموری می‌شود.

با توجه به این‌که تاکنون تحقیقی در خصوص بررسی اثر آنتی‌کارسینوژنی زنجبیل بر رده‌ی سلولی بدخیم اسکواموس سل کارسینومای دهانی انجام نشده، در این مطالعه بر آن شدیم تا خاصیت ضد توموری این گیاه بر رده‌ی سلولی مذکور را مورد مطالعه قرار دهیم. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر عصاره‌ی الکلی ریزوم‌های گیاه Zingiberofficinala بر سلول‌های سرطان اسکواموس سل کارسینوم دهانی در مقایسه با رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش می‌باشد. فرضیه‌ی صفر در این مطالعه آن بود که اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره‌ی الکلی تهیه شده از ریزوم زنجبیل، بر سلول‌های توموری اسکواموس سل کارسینوم دهانی در مقایسه با رده‌ی نرمال فیبروبلاست متفاوت نمی‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی- آزمایشگاهی، ابتدا سلول‌های سرطانی اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) و رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) به عنوان شاهد از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. در ابتدا هر دو رده‌ی سلولی از تانک ازت خارج و مرحله‌ی یخزدایی سلول‌ها انجام گرفت. سپس سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Sigma, USA) غنی شده با حاوی ۱۰ درصد fetal bovine serum (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک پنیسیلین ۱۰۰Unit/ml (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) در انکوباتور CO_2 دار (۵ درصد) با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و میزان RH = ۱۰۰ رشد داده شدند. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی برای اطمینان از درصد بالای سلول‌های زنده‌ی در حال رشد، آزمون viability با رنگ تریپان بلو انجام شد و درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۰ درصد بدست آمد.

تهیه‌ی عصاره‌ی زنجبیل:

گیاه زنجبیل از مؤسسه‌ی تحقیقات طب سنتی و گیاهی ایران (اصفهان، ایران) تهیه شد. سپس ریزوم زنجبیل پس از پوست کندن، رنده شد و مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از آن با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول الکل اتیلیک ۹۶ درجه (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) مخلوط گشته و به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه گردید. سپس از صافی گذرانده شد و حلال آن توسط دستگاه تقطیر در خلأ دوار جدا شد. در مرحله‌ی بعد عصاره‌ی خشک وزن شده و غلظت مورد نظر در محیط کشت DMEM (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) تهیه شد، این محلول از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و استریل گردید (۲۵).

آزمایش MTT (Methyl toluidine blue):

سنجش میزان بقای سلولی از روش رنگ‌سنجی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) استفاده شد. این روش بر پایه‌ی توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فورومازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است (۲۶، ۲۷). این تست بر اساس فعالیت سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌توان پس از حل کردن در DMSO (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) با دستگاه الایزا ریدر سنجش نمود. به منظور انجام این تست سلول میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ۵×۱۰۴ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت، در میکروپلیت‌های ۹۶ کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زنجبیل (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۹۲، ۳۸۴ و ۷۶۸ µg/ml) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های

مذکور، به ازای هر ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر خانه از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس به هر خانه از پلیت ۹۶ بافر گلایسین و DMSO (شرکت مبین تولید تسنیم، اصفهان، ایران) اضافه گردید و بعد از آن که ذرات رنگ به خوبی حل شدند، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA microplate reader قرائت شد.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) به روش ANOVA در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش Tukey انجام شد.

یافته‌ها

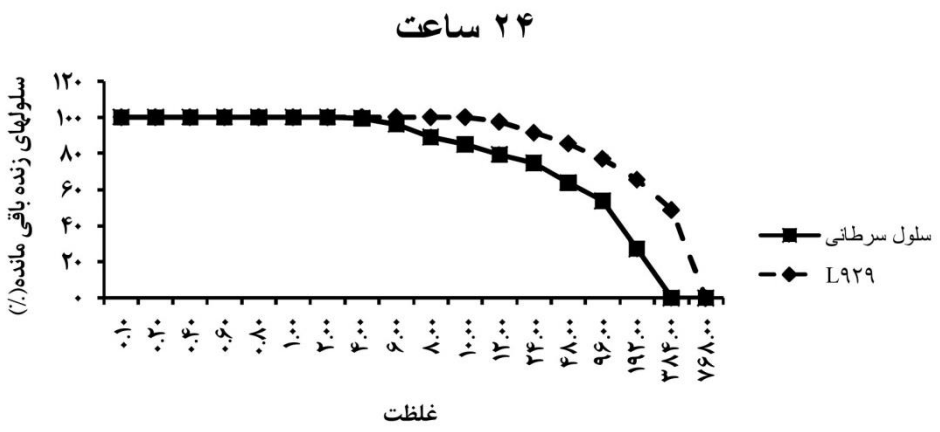
در جدول ۱، اثر غلظت‌های مختلف زنجبیل بر سلول‌های سرطانی و L929 در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد بررسی آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت، اثر کشندگی آن بر سلول افزایش می‌یابد (p value <۰/۰۰۰۱).

جدول ۱: بررسی اثر کشندگی عصاره‌ی زنجبیل بر سلول‌های سرطانی (KB) و رده‌ی سلول طبیعی (L929) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

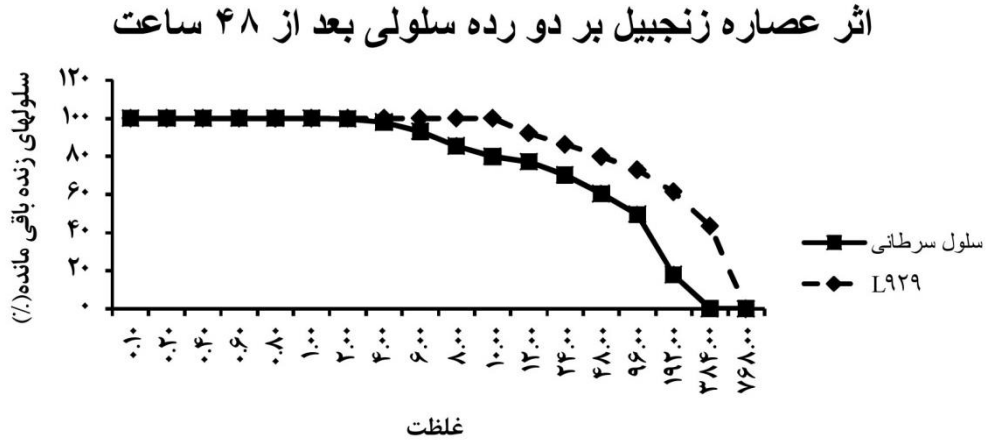
عصاره‌ی زنجبیل (µg/ml)	سلول‌های سرطانی KB			سلول‌های L929		
	میانگین ± خطای استاندارد			میانگین ± خطای استاندارد		
	۲۴	۴۸	۷۲	۲۴	۴۸	۷۲
۲	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}
۴	۹۹/۳۳ ± ۰/۶۷^{a}	۹۷/۸۰ ± ۱/۴۰^{a}	۹۷/۱۰ ± ۱/۷۳^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}
۶	۹۶/۰۰±۱/۱۰^{a}	۹۳/۰۷ ± ۱/۰۹^{b}	۸۹/۷۷ ± ۰/۶۲^{b}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}
۸	۸۸/۹۳ ± ۰/۷۹^{b}	۸۵/۵۰ ± ۰/۲۵^{c}	۸۲/۶۳ ± ۰/۵۲^{c}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}
۱۰	۸۴/۹۳ ± ۱/۱۱^{b}	۷۹/۹۵ ± ۰/۳۶^{d}	۷۸/۱۷ ± ۰/۷۹^{d}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}
۱۲	۷۹/۲۷ ± ۰/۸۹^{c}	۷۷/۱۳ ± ۱/۱۴^{d}	۷۴/۱۷ ± ۰/۶۰^{e}	۹۷/۴۳ ± ۱/۴۴^{a}	۹۲/۲۰ ± ۱/۱۷^{b}	۸۹/۹۰ ± ۱/۵۶^{b}
۲۴	۷۴/۶۳ ± ۱/۳۷^{d}	۷۰/۲۰ ± ۰/۴۶^{e}	۶۸/۲۳ ± ۱/۱۸^{f}	۹۱/۳۳ ± ۰/۷۵^{b}	۸۶/۲۰ ± ۱/۶۲^{c}	۸۳/۶۷ ± ۱/۵۹^{c}
۴۸	۶۳/۸۳ ± ۱/۳۰^{e}	۶۰/۳۳ ± ۱/۳۰^{f}	۵۷/۷۰ ± ۱/۰۲^{g}	۸۵/۳۷ ± ۰/۸۶^{c}	۷۹/۸۳ ± ۰/۳۳^{d}	۷۷/۳۳ ± ۰/۷۳^{d}
۹۶	۵۳/۶۷ ± ۱/۱۶^{f}	۴۹/۴۳ ± ۰/۷۵^{g}	۴۷/۰۷ ± ۰/۸۷^{h}	۷۶/۹۷ ± ۲/۰۰^{d}	۷۲/۸۷ ± ۱/۱۰^{e}	۶۹/۹۷ ± ۱/۰۲^{e}
۱۹۲	۲۷/۰۷ ± ۱/۷۴^{g}	۱۷/۸۰ ± ۱/۴۰^{h}	۱۵/۳۷ ± ۱/۱۴^{i}	۶۵/۴۰ ± ۰/۷۸^{e}	۶۱/۴۰ ± ۰/۷۲^{f}	۵۹/۱۲۷ ± ۰/۴۴^{f}
۳۸۴	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{h}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{i}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{j}	۴۸/۶۷ ± ۰/۹۶^{f}	۴۳/۴۰ ± ۲/۵۱^{g}	۳۶/۳۳ ± ۲/۲۰^{g}
۷۶۸	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{h}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{i}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{j}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{g}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{h}	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{h}

حروف متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌داری در سطح (p value < ۰/۰۰۰۱) دارد.

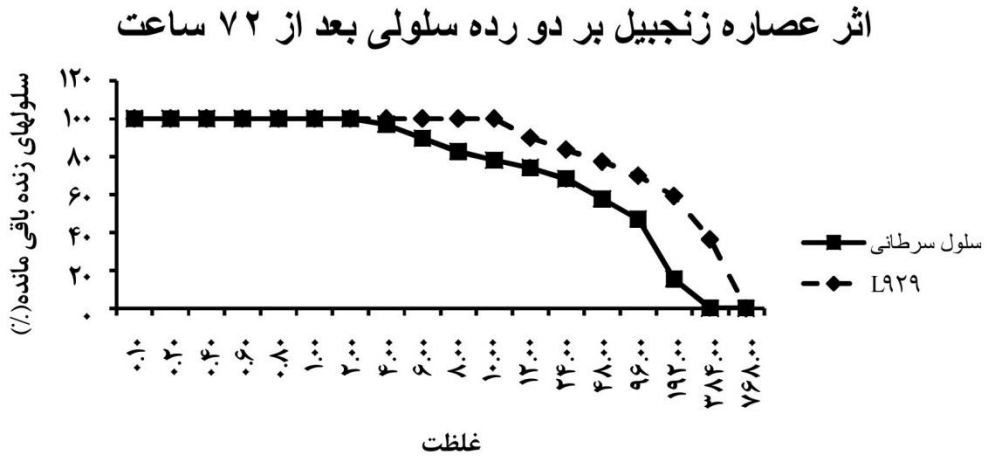
نمودار روند تغییرات زنده‌مانی سلول در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نشان داد که در تمامی ساعات مورد بررسی، غلظت کمتر از ۶µg/ml بر هر دو سلول بی‌تأثیر است، اما از غلظت ۶ و به بعد، تفاوت معنی‌داری بین اثر این عصاره بر دو رده‌ی سلولی وجود دارد. آنالیز t-test مستقل بین غلظت‌های مشابه در دو رده‌ی سلولی انجام شد و نتایج نشان داد که در غلظت ۶ در سطح ۰/۰۵ و از غلظت ۸ تا ۳۸۴ در سطح ۰/۰۰۰۱ بین دو رده‌ی سلولی در واکنش به عصاره‌ی زنجبیل، تفاوت معنی‌داری در تمامی ساعات مورد مطالعه وجود دارد (شکل ۱-۳).



شکل ۱: اثر عصاره‌ی زنجبیل بر دو رده‌ی سلولی در ۲۴ ساعت



شکل ۲: اثر عصاره‌ی زنجبیل بر دو رده‌ی سلولی در ۴۸ ساعت



شکل ۳: اثر عصاره‌ی زنجبیل بر دو رده‌ی سلولی در ۷۲ ساعت

میزان IC50 در این مطالعه برای عصاره‌ی الکلی زنجبیل، در هر دو رده‌ی سلولی KB و L929 در ۲۴ ساعت ابتدایی محاسبه شد. با توجه به این معادله، غلظت مؤثر که در آن ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی KB از بین رفتند برابر با µg/ml ۱۴۸/۸۳ = IC50 و برای رده‌ی سلولی L929 میزان IC50 برابر با µg/ml ۳۵۸/۸۷ بدست آمد. نسبت IC50 سلول L929 به IC50 سلول سرطانی برابر است با ۲/۴۱ که نشان از نیاز بیشتر غلظت عصاره‌ی زنجبیل به میزان تقریباً ۲/۵ برابر نسبت به سلول سرطانی برای مشاهده‌ی اثر کشندگی ۵۰ درصدی روی سلول L929 دارد. همچنین داده‌ها نشان دادند که از غلظت ۶، سلول‌های سرطانی نسبت به عصاره‌ی زنجبیل شروع به واکنش دادند، در حالی که این غلظت برای سلول‌های L929 برابر با ۱۲ بود (جدول ۲).

جدول ۲: میزان IC50 و R^2 در این مطالعه برای عصاره‌ی الکلی زنجبیل، بر هر دو رده‌ی سلولی KB و L929

معادله‌ی سلول‌های نرمال برای محاسبه‌ی IC50	معادله‌ی سلول‌های سرطانی برای محاسبه‌ی IC50
IC = ۹۴/۵ − ۰/۱۲۴ X	IC = ۸۸/۱ − ۰/۲۵۶ X
غلظت زنجبیل = X	غلظت زنجبیل = X
R^2 = ۹۸ درصد	R^2 = ۹۰/۲ درصد

R^2 معیاری از مناسب بودن مدل برای برآورد زنده‌مانی بر اساس غلظت می‌باشد که هرچه به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد بهتر است.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره‌ی تهیه شده از ریزوم گیاه زنجبیل، دارای اثرات کشنده بر سلول‌های توموری اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) با میزان IC50 برابر با µg/ml ۱۴۸/۸۳ می‌باشد، ولی این عصاره بر رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) با غلظت بالاتر (تقریباً دو و نیم برابر) دارای اثرات کشنده بود. به طوری که میزان IC50 رده‌ی سلول نرمال برابر با µg/ml ۳۵۸/۸۷ بدست آمد. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط توکل افشاری و همکاران (۱۹) انجام گرفت، اثر عصاره‌ی الکلی زنجبیل بر سلول‌های سرطان پستان (MCF7) نشان داد، در غلظت ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۵۰ درصد سلول‌های توموری از بین رفته‌اند، ولی عصاره‌ی زنجبیل مورد آزمایش در آن طرح، بر سلول‌های نرمال بی‌تأثیر بود. مقایسه‌ی نتایج ما با مطالعه‌ی توکل افشاری و همکاران (۱۹) نشان داد که عصاره‌ی الکلی زنجبیل دارای اثر بهتری در مهار سلول‌های سرطانی اسکواموس سل کارسینوم دهانی نسبت به سلول‌های سرطان پستان (MCF7) می‌باشد. به طوری که میزان IC50 بر سلول‌های توموری اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) در مطالعه‌ی حاضر معادل µg/ml ۱۴۸/۸۳ بدست آمد، در حالی که میزان IC50 بر سلول‌های توموری پستان (MCF7) در مطالعه‌ی توکل افشاری و همکاران معادل µg/ml ۱۲۵۰ محاسبه گردید. مقایسه‌ی اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره‌ی زنجبیل با متوتروکسات بر رده‌ی سلولی توموری پستان در مطالعه‌ی فخری و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۱ نشان داد، هر دو اثر مهاری مشابهی بر سلول‌های بدخیم مورد مطالعه دارند، ولی عصاره‌ی زنجبیل برخلاف متوتروکسات، اثر کشندگی بسیار کمتری بر سلول‌های نرمال داشت، به طوری که غلظت مورد نیاز عصاره برای مهار سلول‌های نرمال ۵-۶ برابر غلظت آن برای همان میزان مهار سلول‌های بدخیم بدست آمد. در مطالعه‌ی حاضر نیز غلظت کشندگی عصاره بر سلول‌های نرمال، حدود ۲/۵ برابر سلول‌های بدخیم بدست آمد. مقایسه‌ی نتایج این دو مطالعه نشان داد، عصاره‌ی زنجبیل دارای اثر مهاری و کشندگی انتخابی بر سلول‌های بدخیم می‌باشد. شوکلا و سینگ (۱۰) و شار (۱۴) در مطالعاتشان که اثر عصاره‌ی زنجبیل بر مهار و جلوگیری از گسترش سرطان پوست در موش را مورد بررسی قرار داده بودند، نشان دادند عصاره‌ی این گیاه با دارا بودن ترکیباتی همچون gingerol و paradol باعث مهار تومور می‌شود. مطالعه‌ی مروری ونگ و همکاران (۲۶) بر فعالیت آنتی‌کانسری gingerol نشان داد، این ترکیب از طریق تأثیر بر فعالیت‌های بیولوژیک مختلف سلولی شامل آپوپتوز، تنظیم سیکل سلولی، مهار آنژیوژنز و سیتوتوکسیسیتی، اثر

ضد توموری خود را القا می‌کند. بوود و دانگ (۲۴) در سال ۲۰۰۳، اثر gingerol را بر سلول‌های تومور کولون انسان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد، ترکیب gingerol باعث مهار
این رده‌ی سلولی توموری می‌شود. عصاره‌ی زنجبیل به علت دارا بودن ترکیب gingerol که دارای اثرات آنتی‌آنژیوژنیک می‌باشد مانع از رشد تومور و متاستاز آن می‌گردد (۲۷). از دیگر ترکیبات عصاره‌ی زنجبیل، shogaol می‌باشد. در مطالعهی کیم و همکاران (۲۸) که اثر سیتوتوکسیسیتی ترکیبات موجود در عصاره‌ی زنجبیل بر چند رده‌ی سلول بدخیم را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد از بین این ترکیبات، shogaol دارای بیشترین پتانسیل اثر کشندگی بر سلول‌های توموری است. مطالعه‌ی وارین و همکاران (۲۹) نشان داد، shogaol به سرعت در سلول‌های کانسر ریه متابولیزه شده و این ترکیب به همراه متابولیت‌های حاصل از آن با فعال کردن مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری، باعث مرگ سلول‌های توموری ریه می‌شوند. این ترکیبات ابتدا با افزایش میزان گلوتاتیون داخل سلولی منجر به بروز استرس اکسیداتیو داخل سلولی شده و به دنبال این استرس، مولکول‌های القا کننده‌ی آپوپتوز از جمله سیتوکروم c از میتوکندری آزاد گردیده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. در سال ۲۰۱۰ توکل افشاری و همکاران (۲۳)، اثر عصاره‌ی الکلی زنجبیل بر سلول‌های سرطانی کبد (HepG2) را مورد بررسی قرار دادند، که میزان IC50 آن برابر با ۲۵۰۰ µg/ml بدست آمد. مقایسه‌ی نتایج ما با مطالعه‌ی توکل افشاری و همکاران نشان داد، عصاره‌ی زنجبیل دارای اثر بهتری در مهار سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) نسبت به سلول‌های توموری کبد می‌باشد. توکل افشاری و همکاران (۲۳) همچنین مشخص کردند که عصاره‌ی الکلی زنجبیل در غلظت مؤثر دارای هیچ گونه اثر سمی بر رده‌ی سلولی نرمال (L929) نمی‌باشد. اما در مطالعه‌ی ما عصاره‌ی زنجبیل بر رده‌ی سلولی نرمال نیز اثر مهاری نشان داد، البته غلظت مهاری عصاره بر سلول‌های نرمال، ۲/۵ برابر غلظت مورد نیاز برای مهار سلول‌های نرمال بود که باز هم نشان دهنده‌ی اثر مهاری انتخابی این عصاره بر سلول‌های بدخیم می‌باشد. یکی از دلایل اثر انتخابی عصاره‌ی زنجبیل بر سلول‌های بدخیم، غیر فعال کردن ژن‌های بروز یافته در این سلول‌ها است. مطالعه‌ی دیگری (۲۰) نشان داد عصاره‌ی زنجبیل با مهار کردن دو ژن کپی‌برداری تلومراز معکوس (hTERT) و c-Myc که فقط در سلول توموری کارسینوم ریه فعال شده باعث کشندگی این سلول‌ها می‌شود، در حالی‌که بر سلول نرمال که ژن‌های مذکور غیر فعال هستند بی‌تأثیر می‌باشد. در مطالعه‌ی ایلکادی و همکاران (۱۸) اثر مهاری و کشندگی عصاره‌ی زنجبیل بر سلول‌های کانسر پستان و سلول‌های نرمال مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد، عصاره باعث مهار سلول‌های بدخیم می‌شود در حالی‌که بر رده‌ی سلولی نرمال تقریباً بی‌اثر است. در این مطالعه نشان داده شد عصاره‌ی زنجبیل با غیر فعال کردن تعدادی از ژن‌های پیش حیاتی (prosurvival genes) از جمله ژن سوروین، ژن تنظیم کنندهی سیکل سلولی و همچنین فعال‌سازی ژن‌های القا کننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های بدخیم باعث تغییرات ساختار و عملکرد از جمله قطعه قطعه شدن DNA متراکم شدن کروماتین در این سلول‌ها شده و در نهایت منجر به القای آپوپتوز می‌شود. دلیل استفاده از فیبروبلاست در این مطالعه، عدم وجود رده‌ی سلولی نرمال اپی‌تلیوم دهانی در بانک‌های سلولی ایران بود.

به طور خلاصه عصاره‌ی زنجبیل با دارا بودن ترکیباتی از جمله gingerol و shogaol از طریق مهار کردن ژن‌هایی چون ژن کپی‌برداری تلومراز معکوس (hTERT) و c-Myc که فقط در سلول توموری فعال شده‌اند و یا فعال‌سازی ژن‌های القا کننده‌ی مسیر آپوپتوز داخل سلولی، دارای پتانسیل اثر آنتی‌کارسینوژنی بر سلول‌های بدخیمی می‌باشد. نتایج این مطالعه که به بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی و مهار کنندگی عصاره‌ی زنجبیل بر رده‌ی اسکواموس سل کارسینومای دهانی پرداخته نیز نشان داد، این عصاره باعث

مهار و مرگ سلول‌های بدخیم به طور شدیدتری در مقایسه با سلول‌های نرمال می‌شود.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم وجود رده‌ی سلولی اپی‌تلیوم دهانی در بانک‌های ایران اشاره کرد که جهت گروه شاهد بهتر است از این رده استفاده گردد. همچنین با روش MTT می‌توان میزان بقای سلولی، درصد سلول‌های نکروز شده را مورد بررسی قرار داد در حالی‌که نمی‌توان دلیل مرگ سلولی (ناشی از غشاء سلولی- میتوکندری و ...) را بررسی کرد. همچنین قابلیت افتراق بین نکروز و آپوپتوز توسط این روش وجود ندارد. پیشنهاد می‌شود از روش PCR برای بالا بردن دقت مطالعه و همچنین از کیت‌های مخصوص بررسی آپوپتوز سلولی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی الکلی تهیه شده از ریزوم زنجبیل، دارای اثر کشندگی بر سلول‌های سرطان اسکواموس سل کارسینوم دهانی می‌باشد و به نظر می‌رسد القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی (آپوپتوزیس) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره‌ی الکلی زنجبیل ایجاد شده است که بررسی و اثبات این موضوع نیازمند تحقیق بیشتر می‌باشد.

References

1. Lacko M, Braakhuis BJ, Sturgis EM, Boedeker CC, Suárez C, Rinaldo A, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2014; 89(1): 38-48.
2. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Nutraceuticals in the combat against oral cancer. Refuat Hapeh Vehashinayim 2014; 31(2): 8-13.
3. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. Semin Radiat Oncol 2012; 22(2):128-42.
4. Gibson RJ, Keefe DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. Support Care Cancer 2006; 14(9): 890-900.
5. Trueb RM. Chemotherapy-induced alopecia. Semin Cutan Med Surg 2009; 28(1): 4-11.
6. Epstein JB, Schubert MM. Oropharyngeal mucositis in cancer therapy: Review of pathogenesis, diagnosis, and management. Oncology 2003; 17(12): 1767-76.
7. Lin HY, Thomas JL, Chen HW, Shen CM, Yang WJ, Lee MH. In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions. Int J Nanomedicine 2012; 7: 941-51.
8. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2): 72-9.
9. Brown AC, Shah C, Liu J, Pham JT, Zhang JG, Jadus MR. Ginger's (Zingiber officinale Roscoe) inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and angiogenesis in vitro. Phytother Res 2009; 23(5): 640-5.
10. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food Chem Toxicol 2007; 45(5): 683-90.
11. Bode AM, Ma WY, Surh YJ, Dong Z. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. Cancer Res 2001; 61(3): 850-3.
12. Keum YS, Kim J, Lee KH, Park KK, Surh YJ, Lee JM, et al. Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. Cancer Lett 2002; 177(1): 41-7.
13. Lee E, Surh YJ. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. Cancer Lett 1998; 134(2): 163-8.
14. Surh Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutat Res 1999; 428(1-2): 305-27.
15. Abdullah S, Abidin SAZ, Murad NA, Makpol S, Ngah WZW, Yusof YAM. Ginger extract (Zingiber officinale) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. Afr J Biochem Res 2010; 4(5): 134-2.
16. Baliga MS, Haniadka R, Pereira MM, D'Souza JJ, Pallaty PL, Bhat HP, et al. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. Crit Rev Food Sci Nutr 2011; 51(6): 499-523.
17. Banerjee S, Mullick H, Banerjee J, Ghosh A. Zingiber officinale:'a natural gold'. Int J Pharmaceutical Bio-Sci 2011; 2: 283-94.

18. Elkady AI, Abuzinadah OA, Baeshen NA, Rahmy TR. Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs Zingiber officinale. J Biomed Res 2012; 2012: 614356.
19. Tavakkol Afshari J, Moheghi N, Brook A. Ethanolic extract cytotoxic effect of zingiber afficinale in breast cancer (MCF7) cell line. Armaghan-Danesh 2010; 15(2): 115-24. [In Persian].
20. Tuntiwechapikul W, Taka T, Songsomboon C, Kaewtunjai N, Imsumran A, Makonkawkeyoon L, et al. Ginger extract inhibits human telomerase reverse transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. J Med Food 2010; 13(6): 1347-54.
21. Ali BH, Blunden G, Tanira MO. Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research. Food Chem Toxicol 2008; 46(2): 409-20.
22. Fakhri SA, Latif ARA, Al-Khafaji BA. Potentiate the anticancer effect of Methotrexate by Zingiber officinale Roscoe extract. Kufa J Vet Med Sci 2011; 2(2); 67-78.
23. Tavakol Afshari J, Moheghi N, Brouk A. Ethanolic extract cytotoxic effect of Zingiber officinale in Hepatocellular Carcinoma (HEPG2) Cell Line. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Service 2010; 17(3): 52-6.
24. Bode A, Dong ZG. Ginger is an effective inhibitor of HCT116 human colorectal carcinoma in vivo. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003; 12(11): 1324S.
25. Nalbantsoy A, Ayyildiz D, Akgün IH, Karaboz I. Antimicrobial and cytotoxic activities of zingiber officinalis extracts. J Pharm Pharm Sci 2008; 33(2): 78-85.
26. Wang S, Zhang C, Yang G, Yang Y. Biological properties of 6-gingerol: a brief review. Nat Prod Commun 2014; 9(7): 1027-30.
27. Kim EC, Min JK, Kim TY, Lee SJ, Yang HO, Han S, et al. [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 2005; 335(2): 300-8.
28. Kim JS, Lee SI, Park HW, Yang JH, Shin TY, Kim YC, et al. Cytotoxic components from the dried rhizomes of Zingiber officinale Roscoe. Arch Pharm Res 2008; 31(4): 415-8.
29. Warin RF, Chen H, Soroka DN, Zhu Y, Sang S. Induction of lung cancer cell apoptosis through a p53 pathway by [6]-shogaol and its cysteine-conjugated metabolite M2. J Agric Food Chem 2014; 62(6): 1352-62.

Evaluation of the effect of alcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on oral squamous cell carcinoma in comparison with normal rat fibroblast cells

Zahra Golestannejad[1]
Faezeh Khozeimeh[2]
Mohsen Doostmohamadi[3]
Shahin Gavanji[4]
Mohammadreza Golestannejad[5]
Amir Motamedi[6]
Farnaz Farhad[6]

1. Assistant Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Medicine, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2. Associate Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Medicine, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. MSc, Cellular Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University of Isfahan (Khorasgan), Isfahan, Iran.
4. **Corresponding Author:** Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University of Isfahan (Khorasgan), Isfahan, Iran. **Email:** shahin.gavanji@yahoo.com
5. Orthopedic Surgeon, Isa Ben Maryam Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
6. Dentistry Student, Dental Students' Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: Medicinal plants are used to treat various diseases, including malignancies. Since no studies to date have evaluated the effect of Zingiber officinale on oral squamous cell carcinoma, the present study was undertaken to evaluate the anti-tumoral effects of Zingiber officinale on malignant cell lines of oral squamous cell carcinoma.

Materials & Methods: In this in vitro study oral squamous cell carcinoma cells (KB) and normal rat fibroblast cells (L929) as controls were cultured in enriched RPMI-1640 medium. Then extract of Zingiber officinale rhizomes was procured from the Iranian Research Center for Herbal and Traditional Medicine and the cells were treated with 0.1–768 µg/mL concentrations of the extract for 24, 48 and 72 hours. Thereafter, the viability of the cells was assessed by methyl toluidine blue (MTT) method. Statistical analysis was performed with SPSS 20, using one-way ANOVA. Tukey tests were used to compare the mean scores.

Results: In this study IC_{50} was 148.83 and 358.87 µg/mL for KB and L929 cells, respectively. IC_{50} ratio for normal-to-tumoral cells was 358.87:148.83 = 2.41, indicating that a 2.5-fold higher concentration of Zingiber officinale extract is needed for cytotoxic effects on normal cell compared to tumoral cells. Therefore, based on the results, Zingiber officinale extract exhibited more cytotoxic effects on tumoral cells (KB) than on normal cells (L929).

Conclusion: This study showed that the alcoholic extract of Zingiber officinale rhizomes exerted cytotoxic effects on tumoral cells of oral squamous cell carcinoma. Moreover, it exerted more cytotoxic effects on tumoral cells compared to normal cells.

Key words: Ginger, Cytotoxicity, KB Cell, Squamous cell carcinoma.

Received: 22.9.2016 **Revised**: 30.12.2016 **Accepted:** 31.1.2017

How to cite: Golestannejad Z, Khozeimeh F, Doostmohamadi M, Gavanji Sh, Golestannejad M, Motamedi A, Farhad F. Evaluation of the effect of alcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on oral squamous cell carcinoma in comparison with normal rat fibroblast cells. J Isfahan Dent Sch 2017; 13(2): 115-124.