

## Research Paper

# Evaluation of Anti-Cancer Effects of Alcoholic Extract of Ginger on *SORT1* Gene Expression and Viability of the A2780s Ovarian Cancer Cell Line



Zahra Lotfi<sup>1</sup> , Majid Morovati-Sharifabad<sup>1\*</sup> , Elham Salehi<sup>2</sup> , Fatemeh Sarkargar<sup>2</sup> , Gholamhossein Pourghanbari<sup>3</sup>

1. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran.
2. Expert Laboratory of Genetic, Meybod Genetic Research Center, Meybod, Iran.
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran.



**Citation** Lotfi Z, Morovati-Sharifabad M, Salehi E, Sarkargar F, Pourghanbari Gh. [Evaluation of Anti-Cancer Effects of Alcoholic Extract of Ginger on *SORT1* Gene Expression and Viability of the A2780s Ovarian Cancer Cell Line (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(3):418-433. <https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3278.1>

<https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3278.1>



**Received:** 31 Mar 2021  
**Accepted:** 15 Jun 2021  
**Available Online:** 01 Jul 2021

### Key words:

Ovarian cancer, A2780s cells, *Zingiber officinale*, *SORT1* gene

## ABSTRACT

**Aims** Ovarian cancer is the most common fatal malignancy of the female genital tract and is often at an advanced stage when diagnosed. Ginger is one of the most well-known medicinal plants with antioxidant and anti-cancer properties. *SORT1* gene is overexpressed in ovarian cancer cell lines. The present study evaluates the anti-cancer effects of ginger extract on *SORT1* gene expression and viability of the A2780s ovarian cancer cell line.

**Methods & Materials** The viability percentage of the A2780s ovarian cancer cells with ginger extract at concentrations of 40, 60, 80, and 100 µg/mL compared to the control group was evaluated by the Neubauer slide method for 24 hours, and  $IC_{50}$  of the ginger extract was determined within 24 hours. Then, the viability percentage of the cells with 60 µg/mL of ginger extract was investigated at 24, 48, and 72 hours. After treating cells with ginger extract, the cells' RNA was extracted at 24 and 48 hours, then cDNA was synthesized. Finally, the expression of the *SORT1* gene was evaluated compared to the *GAPDH* gene (reference gene) using real-time PCR.

**Findings** Ginger extract in a dose- and time-dependent manner inhibited the viability of ovarian cancer cells. The ginger extract reduced *SORT1* gene expression in A2780s cells.

**Conclusion** The ginger extract has significant inhibitory activity against A2780s ovarian cancer cells. Therefore, with further research, this compound can be used to develop ovarian anti-cancer drugs.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

# E

pithelial ovarian cancer is the most common cause of death among gynecological cancers in the United States, and less than 40% of patients with ovarian cancer recover [1]. The highest prevalence rate has been

reported in the United States, Northern Europe, and lower prevalence in Japan and developing countries [2]. Ovarian cancer is the 8<sup>th</sup> most common cancer and the 12<sup>th</sup> leading cause of death in Iran [3]. Most malignant ovarian tumors are the result of genetic instability. These tumors typically proliferate and are strongly invasive. Because these tumors quickly spread out of the ovaries, especially peritoneum and fallopian tubes, they are usually diagnosed when they involve other parts in addition to the ovary [4]. Epithelial ovarian cancer is

### \* Corresponding Author:

Majid Morovati-Sharifabad, PhD.

Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran.

Tel: +98 (913) 5209520

E-mail: mmorovati@ardakan.ac.ir

the most common ovarian malignancy because they remain asymptomatic until metastasis, with more than two-thirds of patients in advanced stages of the disease when diagnosed [5]. Epithelial ovarian cancer occurs commonly between the ages of 56 and 60. The prevalence of this disease increases with age [6]. Hormones, diet, family history, environmental pollutants, job position, and genetic mutations are also risk factors for ovarian cancer [7].

*SORT1* gene is an NTR3/sortilin encoder with 22 exons in humans and is located on the short arm of chromosome 1, close to the centromere (1p21.3-p13.1). This gene encodes a copy of 7028 nucleotides (NM002959.4), from which a protein with 831 amino acids and a weight of 100 kD (NP002950.3) is translated.

In 1997, Petersen et al. showed that copies of the *SORT1* gene are present in the thyroid, heart, brain, skeletal muscle, spinal cord, placenta, and testicles but not in ovarian tissue [8]. Gene expression profiles in ovarian cancer tissue have shown a fourfold increase in *SORT1* gene expression compared to non-malignant ovarian tissue [9].

The ginger plant, scientifically named *Zingiber officinale*, belongs to the Zingiberaceae family. This medicinal plant is widely used worldwide as an important spice and in traditional medicine. Its essential oil contains more than 46 different compounds such as shogaol, gingerol, gingerdion, terpene, and sesquiterpene, which often have antioxidant properties [10]. The therapeutic properties of this plant include rheumatism, fever, hypertension, vomiting, pain, infection, asthma, diabetes, neurological diseases, digestive problems, inflammation, cancer, and improving sexual health [11].

Gingerol inhibits the growth and proliferation of cancer cells through normal cell death. Ginger's anti-inflammatory capacity is associated with its ability to inhibit cancer by reducing oxidative stress and inducing normal cell death [12]. Quercetin, as one of the flavonoids in ginger, plays a cellular immune role against oxidative stress due to its potent antioxidant activity. It seems that this compound not only protects cells from free radical damage due to its antioxidant effect but also causes programmed cell death through oxidative activity and prevents tumorigenicity [13]. The active compounds of this plant, such as gingerol and shogaol, are well capable of inhibiting the production of inflammatory prostaglandins, nitric oxide inhibitors, and even interleukins involved in inflammation [14]. Cyclooxygenases play a role in all stages of malignant tumorigenesis, such as increased cell proliferation, reduction of apoptosis, angiogenesis, and mobility of cancer cells. Cyclooxygenase enzymes are an important factor in developing ovarian cancer [15]. Gingerol and gingerdion are potent inhibitors of pros-

taglandins by inhibition of cyclooxygenase enzymes [11]. The anti-cancer effect of ginger extract has been reported on cell lines of cancers, such as colon [16], skin [17], liver, breast [18], prostate [19], endometrium [20], and ovary [21]. This study aimed to evaluate the anti-cancer effects of ginger extract on *SORT1* gene expression and viability of the A2780s ovarian cancer cell line.

## 2. Materials and Methods

### Preparation of extract

About 500 g of fresh and coarse rhizome of ginger (*Zingiber officinale*) was prepared in autumn. This species was approved by the expert of the Herbarium Laboratory of Yazd Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yazd City, Iran. After washing, some of it was peeled and cut into thin pieces. The ginger plant was dried in an oven at 50°C and ground. Ethanol 80% was added to the resulting powder. The solution was completely mixed for 3 days using a magnetic device. It was then flattened with Whatman 42 filter paper. To smooth and prepare raw alcoholic extracts, a Buchner funnel was used, and all fine particles were taken. The obtained liquid was placed in the rotary (78°C) to distillation, and the alcohol in it was separated. The extract was stored in autoclave capped glass at 4°C [22].

### Cell culture

In this study, the A2780s cell line (Pasteur Institute, Iran) was used. The cells were cultured in RPMI1640 (Inoclon, Iran) containing 10% FBS (Gibco, the USA) and 1% Pen-strep antibiotic (Inoclon, Iran), and they were incubated at 37°C with a 5% CO<sub>2</sub>.

Every 48 hours, the culture medium was replaced. After reaching 70% density level, the passage was performed. At first, the culture medium of the cells was slowly poured out and washed with PBS. To separate the cells from the flask surface, trypsin was added. After isolation of cells, some culture medium with FBS was added to neutralize the effect of trypsin. After centrifugation (1200 rpm for 5 minutes), the upper medium was discarded, and the new medium was added. Finally, 10 µL of the solution was poured on the Neubauer slide for counting.

### Viability assay

After counting, 25×10<sup>4</sup> cells were cultured in each well of a 24-well plate. After 24 hours of incubation under optimum conditions, for calculating IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration), the medium containing ginger extract with concentrations of 40, 60, 80, and 100 µg/mL were add-

**Table 1.** Primer sequence for real-time PCR

| Primer Name          | Sequence (5' to 3')  | Primer Tm |
|----------------------|----------------------|-----------|
| <i>GAPDH</i> Forward | TCCTCCACCTTTGACGCTG  | 53.3      |
| <i>GAPDH</i> Reverse | CACCACCCTGTTGCTGTAGC | 52.9      |
| <i>SORT1</i> Forward | TCAGAGCCGAATGCCGTAG  | 53.7      |
| <i>SORT1</i> Reverse | CCTCCAGCATCTTTGTCCAG | 53.8      |

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

ed to the wells, and the cells were incubated for 24 hours. To calculate the time, a culture medium containing ginger extract with appropriate concentration (according to the viability percentage of cells in each concentration) was added to the wells. Then, the cells were incubated for 24, 48, and 72 hours. The wells of the control group were treated with a culture medium for 24 hours.

After the desired time, the cells were separated from the plate surface by PBS and trypsinization. After centrifugation, 10  $\mu$ L of cell suspension was poured on the Neubauer slide for counting.

It should be noted that the RPMI1640 medium was used as a solvent to prepare desired concentrations. All experiments have been repeated at least three times.

### RNA extraction

One million cells were cultured into each well of a 6-well plate. The cells were treated with 60  $\mu$ g/mL of ginger extract for 24 and 48 hours. The control group was treated with a culture medium for 24 hours. Cells were centrifuged after separation from plate surface, and cell plaques were quickly transferred to nitrogen tank to maintain RNA. The extraction of RNA was performed according to the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) guidelines. Electrophoresis was performed on an agarose gel to ensure the quality of the extracted RNA. The presence of two clear bands on the gel confirmed the health of the extracted RNA. For quantitative investigation of extracted RNA, an optical absorption ratio of 260/280 and 260/230 nm was obtained by NanoDrop. This ratio was between 1.7 and 1.9 in all samples, indicating the high purity of extracted RNA.

### c-DNA synthesis

cDNA synthesis was performed based on the Thermo Scientific Kit protocol. About 1  $\mu$ L RNA, 1  $\mu$ L Random Hexamer, and 6  $\mu$ L DEPC water were mixed, spun, and incubated in a thermal cycler for 5 min at 65°C. About 4

$\mu$ L 5x reaction buffer, 2  $\mu$ L dNTP, and 1  $\mu$ L RT enzyme were added to it and reached the final volume of 20  $\mu$ L with D.D.W. The temperature-time program was performed as follows: 25°C for 10 min, 42°C for 60 min and 65°C for 10 min. Using the NanoDrop device, the synthesized cDNA quality was ensured.

### Real-time PCR

Sequences of *SORT1* and *GAPDH* genes were obtained from the NCBI website. Dedicated primers were designed by the gene runner program and blasted by NCBI (Table 1). For real-time PCR, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) was used. About 10  $\mu$ L SYBR green, 1  $\mu$ L of forward and reverse primers of each gene, 5  $\mu$ L cDNA was mixed and reached the final volume of 20  $\mu$ L with D.D.W. The temperature-time program was performed as follows: 95°C for 1 min, 95°C for 15 s, and 60°C for 60 s. To ensure the specificity of the product, the melting curve was investigated. All experiments in this study were repeated three times. Gene expression was measured by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

### Statistical analysis

After measuring the gene expression by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and using Excel software, the obtained data from real-time PCR and viability assay sections were analyzed with 1-way ANOVA and Tukey's test in SPSS v. 25. The results were calculated as Mean $\pm$ Standard Deviation, and  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### IC<sub>50</sub> assay

The percentage of living cells compared to the control group (Mean $\pm$ SD) in the treated groups with concentrations of 40, 60, 80, and 100  $\mu$ g/mL extracts of ginger after 24 hours is shown in Figure 1. According to the results, ginger extract in different concentrations significantly decreased

**Table 2.** Comparison of *SORT1* gene expression in different groups

| Groups          | Fold Chang | Interpret  |
|-----------------|------------|------------|
| 24 h v. control | 0.727      | Down: 1.37 |
| 48 h vs control | 0.452      | Down: 2.21 |
| 48 h vs 24 h    | 0.621      | Down: 1.61 |

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

the percentage of living cells compared to the control group, and the treatment groups also had a significant difference. This diagram shows that ginger extract in a dose-dependent manner reduces the viability of A2780s cells. The  $IC_{50}$  of ginger extract at 24 hours is 76.8  $\mu\text{g/mL}$ . A concentration of 60  $\mu\text{g/mL}$  in which 66% of the cells survived was selected for further investigation.

#### Investigation of cell viability at different times

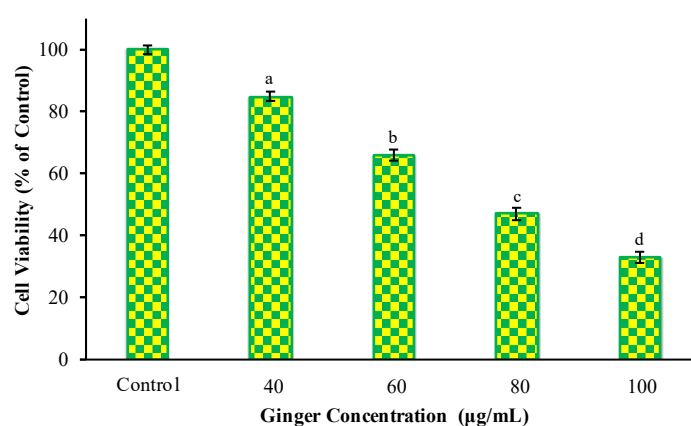
Figure 2 shows the percentage of living cells (Mean $\pm$ SD) in groups treated with 60  $\mu\text{g/mL}$  concentrations of ginger extract at 24, 48, and 72 hours compared to the control group. Ginger extract at different times, after adding the extract, significantly decreases the percentage of living cells compared to the control group. Treatment groups also showed significant differences. This diagram indicates that ginger extract reduces the viability of A2780s cells in a time-dependent manner.

#### *SORT1* gene expression analysis

Figure 3 shows that *SORT1* gene expression level in cells treated with 60  $\mu\text{g/mL}$  concentration of ginger extract decreased significantly at 24 and 48 hours compared to the control group. Gene expression significantly decreased in cells treated with ginger extract for 48 hours compared to cells treated with ginger extract for only 24 hours. Table 2 compares the reduction of gene expression in different groups.

#### 4. Discussion

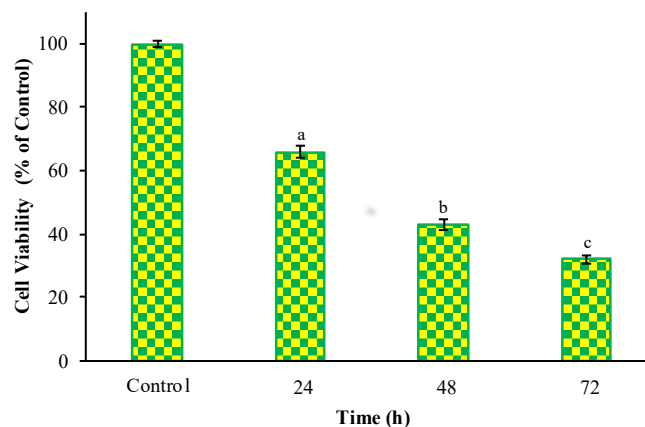
The present study results showed that the alcoholic extract prepared from fresh ginger rhizome has a lethal effect on the A2780s ovarian cancer cell line. We found that with increasing the concentration of ginger extract in 24 hours, the cell viability percentage decreased significantly compared to the control group. In addition, the percentage of living cells decreased significantly compared to the control group by increasing the duration of treatment of cancer cells with a concentration of 60  $\mu\text{g/mL}$  of ginger extract. The results



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 1.** Percentage of living cells compared to the control group in the treated groups with concentrations of 40, 60, 80, and 100  $\mu\text{g/mL}$  extracts of ginger after 24 hours

a: A significant difference between the control and other treatment groups; b: A significant difference between the control and other treatment groups; c: A significant difference between the control and other treatment groups; d: A significant difference between the control and other treatment groups ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Percentage of living cells compared to control group in groups treated with 60 µg/mL concentrations of ginger extract at 24, 48, and 72 hours

a: A significant difference between the control and other treatment groups; b: A significant difference between the control and other treatment groups; c: A significant difference between the control and other treatment groups ( $P < 0.05$ ).

of real-time PCR showed that treatment of cancer cells with 60 µg/mL concentration of ginger extract for 24 and 48 hours significantly reduced *SORT1* gene expression compared to the control group.

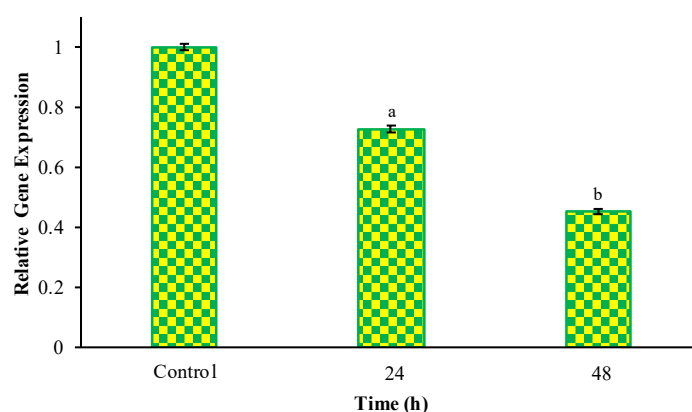
During a study on colon cancer cells, the results showed that ginger extract inhibits proliferation and induces apoptosis in HT29 and HCT116 cell lines by stopping cell cycles in G0/G1 stage and decreasing DNA synthesis [16]. In another study, 6-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, and 10-shogaol prevented the proliferation of pc3R prostate cancer cell lines by inhibition of GSTλ and MRP1 proteins [19]. In another study, they found that terpenoids in ginger extract induce apoptosis in endometrial cancer cell lines by activating the p53 pathway. Also, treatment of endometrial cancer cells with ginger extract leads to a significant increase in intracellular calcium, a decrease in mitochondrial membrane potential, an increase in caspase-3 expression, and a significant reduction in Bcl-2 expression [20].

Phenolic composition of 6-gingerol inhibits the growth and proliferation of skin carcinoma cells and induces apoptosis, regulates mitochondrial function by ROS through disruption of Bax/BCL-2 ratio, and up-regulation of cytochrome C, caspase-3, and -9, and induces caspase cascades. Therefore, 6-gingerol can effectively treat skin cancer [17]. Kim et al. evaluated the antitumor and anti-angiogenesis activity of ginger rhizome extract on VEGF and MTA1 factors, which played a major role in angiogenesis in cancer cells. They concluded that gingerol in ginger rhizome extract could effectively reduce VEGF and MTA1 inducing cell proliferation [23]. Gingerols are a promising factor in

cancer treatment because of their ability to prevent NF-κB activation, induce apoptosis and inhibit proliferation, invasion, metastasis, and angiogenesis. Dose-dependent gingerols increase the fracture levels of caspase -9, -7, -3, and PARP and reduce the expression of BCL2 [24].

6-Shogaol and 6-gingerol effectively inhibit invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through various molecular mechanisms, including inhibition of the MAPK and PI3k/Akt pathways and NF-κB and STAT3 activities to suppress the expression of MMP-2/-9 and uPA and block angiogenesis [25]. Methanolic extract of ginger has significant inhibitory activity against liver cancer cells (HePG2) and breast cancer cells (MCF7). Gingerol and paradol are essential in inhibiting cell growth through oxidation-reduction reaction by trapping free radicals, ultimately reducing reactive oxygen [18]. In another study, the ginger extract inhibited the activity of the MMP-9 enzyme in a concentration-dependent manner and thus inhibited migration in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. In this study, the ginger extract inhibited the viability of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner [26]. In another study, the researchers used in silico method. They found the beneficial role of 6-gingerol and 6-shogaol compounds as growth inhibitors and modulators of lymphangiogenesis and angiogenesis molecules (VEGF-A, VEGF-C, Nrp2, angio-pietin-2, PDGF-B, KDR, SERPINFI, etc.). They play a role in the metastatic progression of breast cancer [27].

Liang et al. reported that 6-shogaol increased ROS production, increased expression of Bax, caspase-9, and -3, and decreased expression of cyclin D1, PCNA, IL-6, JAK,



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 3.** Percentage of living cells compared to the control group in groups treated with 60 µg/mL concentration of ginger extract decreased significantly at 24 and 48 hours

a: A significant difference between the control and other treatment groups; b: A significant difference between the control and other treatment groups ( $P < 0.05$ ).

and Bcl-2 in the A2780 ovarian cancer cell line. They showed that 6-shogaol caused apoptosis by inhibiting STAT-3 transmission in ovarian cancer cells and inhibiting the growth of ovarian cancer cells [21]. Another study was conducted on zerombon, another compound found in ginger. The results showed that zerombon better than cisplatin induces cell death in ovarian and cervical cancer cell lines by stimulating apoptosis. Zerombon inhibits the cellular cycle at the G2/M stage in a dose-dependent manner and significantly decreases IL-6 secretion levels in CAOV-3 and HeLa cell lines [28]. Rhode et al. showed that ginger selectively inhibits the growth of ovarian cancer cells compared to normal ovarian epithelial cells. In addition, ginger inhibits the products of the NF-κB regulatory gene, including IL-8, and VEGF, which are involved in cell proliferation and cellular angiogenesis. According to the results of this study, 6-shogaol is the most active ginger substance tested in ovarian cancer cells [29]. In another study, researchers reported dose- and time-dependent reductions in the number of ovarian cancer cells treated with 10-gingerol. Reduction of cancer cell proliferation was associated with an increase in the percentage of cells in the G2 phase of the cell cycle and a decrease in the percentage of cells in the G1 stage. Ovarian cancer cells showed a decrease in cyclin A, B1, and D3 expression after exposure to 10-gingerol [30]. In another study conducted on ovarian cancer cells, the growth of SKOV-3 cell line cells was significantly inhibited by the ginger extract. This study showed a more than 0.4-fold decrease in Bcl-2 gene expression after treatment with ginger extract, and the p53 gene expression level increased about 7 times in cells treated with ginger extract compared to the control group. Therefore, the researchers

concluded that the p53 gene stimulates apoptosis by deleting the Bcl-2 gene [31].

The results of this study confirmed previous research studies on ginger extract as effective anti-cancer plant material and demonstrated its effect on the A2780s cell line.

## 5. Conclusion

Ginger extract has an inhibitory effect on the survival of the A2780s ovarian cancer cell line in a dose-dependent and time-dependent manner. It also reduces *SORT1* gene expression in A2780s cells. The present study confirms previous research studies and promises that ginger extract has a toxic effect on the A2780s ovarian cancer cell line, and this compound can be used to develop ovarian anti-cancer drugs.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was conducted at Cell and Developmental Laboratory of the Basic Sciences Department, Faculty of Veterinary Sciences, Ardakan University (Code: IR.YAZD.REC.1399.035).

### Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

#### Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

#### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors want to thank the sincere cooperation of Ardakan University Laboratory Officer, Mr. Mohsen Rashidi.

## مقاله پژوهشی

# بررسی اثرات ضدسرطان عصاره الکلی از زنجبیل بر بیان ژن SORT1 و زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان رده سلول A2780S

زهرا لطفی<sup>۱</sup>، \*مجید مروتی شریف‌آباد<sup>۱</sup>، الهام صالحی<sup>۱</sup>، فاطمه سرکارگر<sup>۲</sup>، غلامحسین پورقنبری<sup>۳</sup>

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران.
۲. آزمایشگاه تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک میبده میبده، ایران.
۳. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۱ فروردین ۱۴۰۰  
تاریخ پذیرش: ۲۵ خرداد ۱۴۰۰  
تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۰

**اهداف:** سرطان تخمدان شایع‌ترین بدخیمی کشنده دستگاه تناسلی زنان است که اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود. زنجبیل یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی است که دارای خواص آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان است. ژن SORT1 در سلول‌های سرطانی تخمدان بیش از حد بیان می‌شود. این مطالعه، اثرات ضدسرطان عصاره زنجبیل بر بیان ژن SORT1 و قابلیت زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان A2780S را ارزیابی می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 با عصاره زنجبیل در غلظت‌های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد، با استفاده از روش اسلاید نوبائتر به مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و IC<sub>50</sub> عصاره زنجبیل در عرض ۲۴ ساعت تعیین شد. سپس درصد زنده ماندن سلول‌ها با ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره زنجبیل در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. پس از درمان سلول‌ها با غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره زنجبیل در ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌های RNA استخراج شد و CDNA سنتز شد. سپس، بیان ژن SORT1 نسبت به ژن (GAPDH ژن مرجع) با استفاده از زمان واقعی PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** عصاره زنجبیل به شکل وابسته به دُز و زمان، زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان را مهار می‌کند. عصاره زنجبیل باعث کاهش بیان ژن SORT1 در سلول‌های A2780 می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره زنجیره فعالیت‌مهری بسیار مهمی در برابر سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 دارد. بنابراین، با تحقیقات بیشتر در آینده، این ترکیب را می‌توان برای توسعه داروهای ضدسرطان تخمدان استفاده کرد.

### کلیدواژه‌ها:

سرطان تخمدان، سلول‌های A2780s، گیاه Zingiber Affici-nale، ژن SORT1

### مقدمه

می‌شوند و چون به سرعت از تخمدان‌ها، به‌ویژه صفاق و لوله‌های فالوپ خارج می‌شوند، معمولاً زمانی تشخیص داده می‌شوند که علاوه بر تخمدان، سایر قسمت‌ها را نیز درگیر کنند [۴]. سرطان تخمدان اپیتلیال شایع‌ترین بدخیمی تخمدان است، زیرا تا زمان متاستاز بدون علامت باقی می‌ماند و بیش از دوسوم بیماران در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند [۵]. سرطان تخمدان اپیتلیال در سنین ۵۶ تا ۶۰ سالگی شایع‌تر است. شیوع این بیماری با افزایش سن افزایش می‌یابد [۶]. هورمون‌ها، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی، آلایندگی‌های محیطی، موقعیت شغلی و جهش‌های ژنتیکی نیز از عوامل خطر سرطان تخمدان هستند

سرطان تخمدان اپیتلیال، شایع‌ترین سرطان کشنده در زنان ایالات متحده است و کمتر از ۴۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان تخمدان بهبود می‌یابند [۱]. بیشترین میزان شیوع، در ایالات متحده، اروپای شمالی و شیوع کمتر در ژاپن و کشورهای در حال توسعه گزارش شده است [۲]. سرطان تخمدان هشتمین سرطان شایع و دوازدهمین علت مرگ‌ومیر در ایران است [۳]. اکثر تومورهای بدخیم تخمدان نتیجه بی‌ثباتی ژنتیکی هستند. این تومورها معمولاً به سرعت رشد می‌کنند و به شدت پیش‌رونده

\* نویسنده مسئول:

مجید مروتی شریف‌آباد

نشانی: اردکان، دانشگاه اردکان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه.

تلفن: ۰۹۵۲۰۹۵۲۰ (۹۱۳) ۰۹۸

پست الکترونیکی: mmorovati@ardakan.ac.ir



این مطالعه بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره زنجبیل بر بیان ژن SORT1 و زنده ماندن رده سلولی A2780s سلول‌های سرطانی تخمدان بود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره

حدود ۵۰۰ گرم ریزوم تازه و درشت زنجبیل<sup>۱</sup> در پاییز تهیه شد. این گونه مورد تأیید کارشناس آزمایشگاه گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی یزد واقع شد. بعد از شستن، مقداری از آن را پوست کنده و به قطعات نازک برش دادند. گیاه زنجبیل در فر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد. اتانول ۸۰ درجه به پودر حاصل اضافه شد. محلول به مدت ۳ روز با استفاده از آهن‌ربای مغناطیسی کاملاً مخلوط شد. سپس با کاغذ صافی Whatman ۴۲ صاف شد. برای صاف کردن و تهیه عصاره‌های الکلی خام از کیف بوشنر استفاده شد و کلیه ذرات ریز گرفته شد. مایع به‌دست‌آمده برای تقطیر در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و الکل موجود در آن جدا شد. عصاره در شیشه درپوش اتوکلاو در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۲].

### کشت سلولی

در این مطالعه از رده سلولی A2780s (انستیتو پاستور، ایران) استفاده شد. سلول‌ها در RPMI1640 (Inoclon ایران) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco ایالات متحده آمریکا) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک Pensterep (Inoclon ایران) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند.

هر ۴۸ ساعت، محیط کشت جایگزین شد. پس از رسیدن به سطح تراکم ۷۰ درصد، عبور انجام شد. ابتدا محیط کشت سلول‌ها به آرامی بیرون ریخته و با PBS شسته شد. برای جداسازی سلول‌ها از سطح فلاسک، تریپسین اضافه شد. پس از جداسازی سلول‌ها، مقداری محیط کشت با FBS برای خنثی کردن اثر تریپسین اضافه شد و پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) محیط فوقانی دور ریخته شد و محیط جدید اضافه شد. ۱۰ میکرولیتر محلول برای شمارش روی لام نئوباتر ریخته شد.

### سنجش زنده بودن

پس از شمارش، ۲۵×۱۰۴ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ چاهی کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط بهینه، برای محاسبه IC<sub>50</sub> (نیم حداکثر غلظت بازدارنده)، محیط حاوی عصاره زنجبیل با غلظت‌های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت

[۷]. ژن SORT1 یک رمزگذار NTR3/Sortilin است که دارای ۲۲ اگزون در انسان است و روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱، نزدیک به سانترومر (1p21.3-p13.1) قرار دارد. این ژن یک کپی از ۷۰۲۸ نوکلئوتید (NM002959.4) را رمزگذاری می‌کند که از آن پروتئینی با ۸۳۱ اسیدآمینو و وزن ۱۰۰ کیلو دالتون (NP002950.3) ترجمه شده است [۸].

پترسن و همکاران نشان داد که نسخه‌هایی از ژن SORT1 در تیروئید، قلب، مغز، ماهیچه‌های اسکلتی، نخاع، جفت و بیضه‌ها وجود دارد، اما در بافت تخمدان یافت نمی‌شود. نمایه‌های بیان ژن در بافت سرطان تخمدان افزایش چهاربرابری در بیان ژن SORT1 در مقایسه با بافت غیربدخیم تخمدان نشان داده است [۹].

گیاه زنجبیل با نام علمی Zingiber officinale متعلق به خانواده Zingiberaceae است. گیاهی دارویی که در سراسر جهان به عنوان یک ادویه مهم و همچنین در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد و اسانس آن حاوی بیش از ۴۶ ترکیب مختلف مانند sesquiter- و shogaol، gingerol، gingerdion، terpene pene است که اغلب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند [۱۰]. طیف وسیعی از درمان‌های این گیاه شامل روماتیسم، تب، فشار خون، استفراغ، درد، عفونت، آسم، دیابت، بیماری‌های عصبی، مشکلات گوارشی، التهاب، سرطان و تقویت قوای جنسی است [۱۱].

Gingerol از طریق مرگ طبیعی سلولی، از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و ظرفیت ضدالتهابی زنجبیل با توانایی آن در مهار سرطان با کاهش استرس اکسیداتیو و القای مرگ سلولی طبیعی مرتبط است [۱۲]. Quercetin به عنوان یکی از فلاونوئیدهای موجود در زنجبیل به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، نقش ایمنی سلولی را در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند، به نظر می‌رسد این ترکیب نه تنها به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی خود از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند، بلکه باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از طریق فعالیت اکسیداتیو و جلوگیری از تومورزایی می‌شود [۱۳]. ترکیبات فعال این گیاه مانند gingerol و shogaol به خوبی قادر به مهار تولید پروستاگلاندین‌های التهابی، مهارکننده‌های اکسید نیتریک و حتی اینترلوکین‌های دخیل در التهاب هستند [۱۴]. سیکلوکسیژنازها در تمام مراحل تومورزایی بدخیم مانند افزایش تکثیر سلولی، کاهش آپوپتوز، رگزایی و تحرک سلول‌های سرطانی نقش دارند. آنزیم‌های سیکلوکسیژناز عامل مهمی در ایجاد سرطان تخمدان هستند [۱۵]. Gingerol و gingerdion با مهار آنزیم‌های سیکلوکسیژناز، مهارکننده‌های قوی پروستاگلاندین‌ها هستند [۱۱].

اثر ضدسرطانی عصاره زنجبیل بر رده‌های سلولی سرطان‌هایی مانند روده بزرگ [۱۶]، پوست [۱۷]، کبد، سینه [۱۸]، پروستات [۱۹]، آندومتر [۲۰] و تخمدان [۲۱] گزارش شده است. هدف از

1. Zingiber officinale

و توسط NCBI بلاست شدند (جدول شماره ۱).

برای Real-time PCR، از SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems، Warrington، UK) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر SYBR سبز، ۱ میکرولیتر پرایمرهای فوروارد و معکوس از هر ژن با ۵ میکرولیتر cDNA مخلوط شده و با D.D.W به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه دما زمان به این صورت انجام شد: ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه. برای اطمینان از ویژگی محصول، منحنی ذوب بررسی شد. تمام آزمایشات در این مطالعه سه بار تکرار شد. بیان ژن با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اندازه گیری شد.

### تحلیل آماری

پس از اندازه گیری بیان ژن به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و با استفاده از نرم افزار EXCEL، داده های به دست آمده از بخش Real Time PCR و سنجش زنده ماننی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵، آزمون یک طرفه آنووا و توکی انجام شد. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

### یافته ها

#### سنجش $IC_{50}$

درصد سلول های زنده نسبت به گروه کنترل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گروه های تیمار شده با غلظت های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ عصاره زنجبیل پس از ۲۴ ساعت در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج این نمودار، عصاره زنجبیل در غلظت های مختلف، درصد سلول های زنده را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد و گروه های تیمار نیز تفاوت معنی داری داشتند. این نمودار نشان می دهد که عصاره زنجبیل به روشی وابسته به دوز، زنده ماندن سلول های A2780s را کاهش می دهد.  $IC_{50}$  عصاره زنجبیل در ۲۴ ساعت، ۷۶/۸ میکروگرم در میلی لیتر است. غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر که در آن ۶۶ درصد سلول ها زنده ماندند بود برای بررسی بیشتر انتخاب شد.

#### بررسی زنده ماندن سلول ها در زمان های مختلف

نتایج موجود در تصویر شماره ۲، درصد سلول های زنده (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) را در گروه های تیمار شده با غلظت های ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زنجبیل در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل نشان می دهد. عصاره زنجبیل در زمان های مختلف، پس از افزودن عصاره، درصد سلول های زنده را نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش می دهد. گروه های تیمار نیز تفاوت معنی داری دارند. این نمودار نشان می دهد که عصاره زنجبیل زنده ماندن سلول های A2780s را به روشی وابسته به زمان کاهش می دهد.

انکوبه شدند. برای محاسبه زمان، محیط کشت حاوی عصاره زنجبیل با غلظت مناسب (با توجه به درصد زنده ماندن سلول ها در هر غلظت) به چاهک ها اضافه شد و سلول ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. چاهک های گروه کنترل به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت تیمار شدند.

پس از مدت زمان مورد نظر، سلول ها توسط PBS و تریپسیناسیون از سطح صفحه جدا شدند. پس از سانتریفیوژ، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی برای شمارش روی لام نئوبار ریخته شد.

از محیط RPMI1640 به عنوان حلال برای تهیه غلظت های مورد نظر استفاده شد. تمام آزمایش ها حداقل سه بار تکرار شده اند.

### استخراج RNA

۱ میلیون سلول در هر چاهک پلیت ۶ چاهی کشت داده شد. سلول ها با ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره زنجبیل به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. گروه کنترل به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت تحت تیمار قرار گرفتند. سلول های سانتریفیوژ شده پس از جدا شدن از سطح صفحه و پلاک های سلولی به سرعت به مخزن نیتروژن برای حفظ RNA منتقل شدند. استخراج RNA بر اساس دستورالعمل های کیت جداسازی RNA خالص (Roche) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد. وجود دو نوار شفاف روی ژل، سلامت RNA استخراج شده را تأیید کرد. برای بررسی کمی RNA استخراج شده، نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ (نانومتر) توسط نانوقطره به دست آمد. این نسبت در همه نمونه ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود که نشان دهنده خلوص بالای RNA استخراج شده است.

### سنتر c-DNA

سنتر cDNA بر اساس پروتکل Thermo Scientific Kit انجام شد. ۱ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر هگزامر تصادفی، ۶ میکرولیتر آب Depce مخلوط و چرخانده شدند و در سیکلر حرارتی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. ۴ میکرولیتر بافر واکنش 5x، ۲ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر آنزیم RT به آن اضافه شد و با D.D.W به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه دما زمان به این صورت انجام شد: ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ دقیقه و ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه. با استفاده از دستگاه نانوقطره، کیفیت cDNA سنتز شده تضمین شد.

### زمان واقعی PCR

توالی ژن های SORT1 و GAPDH از سایت NCBI به دست آمد. پرایمرهای اختصاصی توسط برنامه gene runner طراحی

جدول ۱. توالی پرایمر برای Real-time PCR

| Primer Name   | Sequence (5' to 3')   | Primer Tm |
|---------------|-----------------------|-----------|
| GAPDH Forward | TCCTCCACCTTTGACGCTG   | 53.3      |
| GAPDH Reverse | CACCACCCTGTTGCTGTAGC  | 52.9      |
| SORT1 Forward | TCAGAGCCGAATGCCGTAG   | 53.7      |
| SORT1 Reverse | CCTTCCAGCATCTTTGTCCAG | 53.8      |

### افتخ دانش

G0/G1 و کاهش سنتز DNA، تکثیر را مهار کرده و باعث القای آپوپتوز در رده‌های سلولی HT29 و HCT116 می‌شود [۱۶]. در مطالعه دیگری، 6-shogaol، 10-gingerol، 6-gingerol و 10-shogaol با مهار پروتئین‌های GST $\lambda$  و MRP1 از تکثیر سلول‌های سرطانی پروستات، رده‌های سلولی pc3R جلوگیری کردند [۱۹]. در مطالعه دیگری، آن‌ها دریافتند که ترپنوئیدهای موجود در عصاره زنجبیل با فعال کردن مسیر P53 باعث القای آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان آندومتر می‌شوند. همچنین درمان سلول‌های سرطانی آندومتر با عصاره زنجبیل منجر به افزایش قابل توجه کلسیم داخل سلولی، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، افزایش بیان کاسپاز-۳ و کاهش قابل توجه بیان Bcl-2 می‌شود [۲۰].

ترکیب فنلی 6-gingerol از رشد و تکثیر سلول‌های سرطان پوست جلوگیری می‌کند و باعث القای آپوپتوز می‌شود. همچنین عملکرد میتوکندری را توسط ROS از طریق اختلال در نسبت Bax/BCL-2 تنظیم می‌کند و سیتوکروم C، کاسپاز ۳ و ۹ را افزایش می‌دهد و باعث القای آپوپتوز می‌شود. بنابراین، 6-gingerol می‌تواند به طور مؤثر برای درمان سرطان پوست استفاده شود [۱۷]. کیم و همکاران فعالیت ضدتوموری و ضدگزیایی عصاره ریزوم زنجبیل را بر روی فاکتورهای VEGF و MTA1 که نقش عمده‌ای در رگ‌زایی در سلول‌های سرطانی ایفا می‌کنند، ارزیابی کردند و به این نتیجه رسید که gingerol موجود در عصاره ریزوم زنجبیل می‌تواند در کاهش تکثیر سلولی الفاکننده VEGF و MTA1 مؤثر باشد [۲۳]. gingerol به دلیل توانایی آن‌ها در جلوگیری از فعال شدن NF- $\kappa$ B، القای آپوپتوز و مهار تکثیر، مهاجم، متاستاز و رگ‌زایی، به عنوان عاملی در

### تجزیه و تحلیل بیان ژن SORT1

نتایج موجود در تصویر شماره ۳ نشان می‌دهد که سطح بیان ژن SORT1 در سلول‌های تیمارشده با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل در ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است. بیان ژن در سلول‌های تیمارشده با عصاره زنجبیل به مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با سلول‌های تیمارشده با عصاره زنجبیل به مدت ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری کاهش یافت. جدول شماره ۲ کاهش بیان ژن را در گروه‌های مختلف مقایسه می‌کند.

### بحث

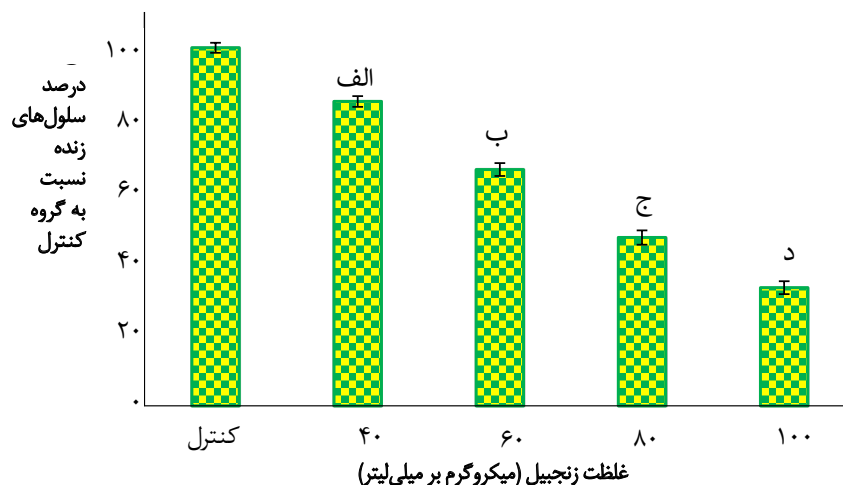
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره الکلی تهیه‌شده از ریزوم زنجبیل تازه بر سلول‌های سرطانی تخمدان، رده سلولی A2780s اثرکننده دارد. در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت عصاره زنجبیل در ۲۴ ساعت، درصد زنده ماندن سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. علاوه بر این، با افزایش مدت‌زمان تیمار کردن سلول‌های سرطانی با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل، درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج Real Time PCR نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بیان ژن SORT1 را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد.

در یک مطالعه بر روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ، نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل با توقف چرخه سلولی در مرحله

جدول ۲. مقایسه بیان ژن SORT1 در گروه‌های مختلف

| Groups          | Fold Chang | Interpret  |
|-----------------|------------|------------|
| 24h vs. control | 0.727      | Down: 1.37 |
| 48h vs. control | 0.452      | Down: 2.21 |
| 48h vs. 24h     | 0.621      | Down: 1.61 |

### افتخ دانش



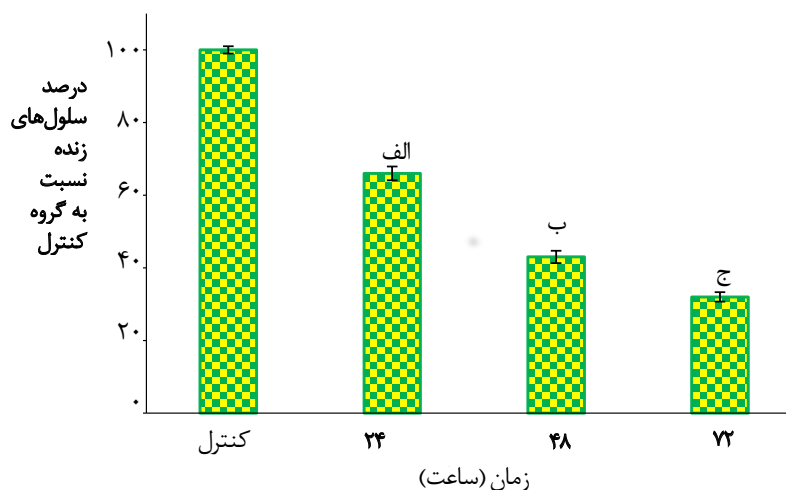
تصویر ۱. درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰.۰۴، ۰.۰۶، ۰.۰۸ و ۰.۱ عصاره زنجبیل پس از ۴۲ ساعت

الف: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های درمانی بیان می‌کند؛ ب: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های درمانی بیان می‌کند؛ ج: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های درمانی بیان می‌کند؛ د: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های درمانی بیان می‌کند ( $P < 0.05$ ).

است. Gingerol و paradol نقش مهمی در مهار رشد سلولی از طریق واکنش کاهش اکسیداسیون با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند که در نهایت باعث کاهش اکسیژن فعال می‌شود [۱۸]. در مطالعه دیگری، عصاره زنجبیل فعالیت آنزیم MMP-9 را به روشی وابسته به غلظت مهار کرد و در نتیجه مهاجرت در سلول‌های سرطان سینه، رده سلولی MDA-MB-231 را مهار کرد. در این مطالعه، عصاره زنجبیل زنده ماندن سلول‌های MDA-MB-231 را به روشی وابسته به غلظت مهار کرد [۲۶]. در پژوهشی دیگر، محققان با استفاده از روش سیلیکو نقش مفیدی از ترکیبات 6-gingerol و 6-shogaol را به عنوان

درمان سرطان امیدوارکننده هستند. gingerol‌های وابسته به دژ، سطوح شکستگی کاسپاز ۹، ۷، ۳ و PARP را افزایش و بیان BCL2 را کاهش می‌دهند [۲۴].

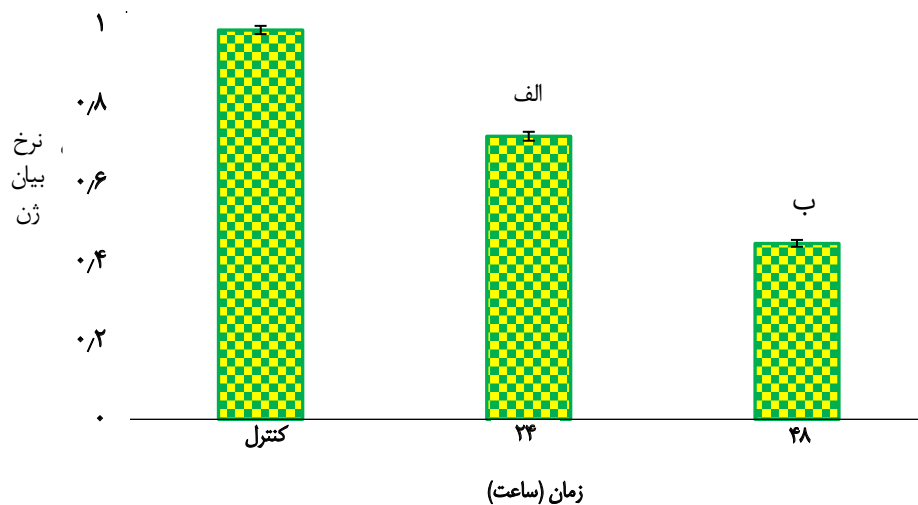
6-gingerol و 6-Shogaol از طریق مکانیسم‌های مولکولی مختلف، از جمله مهار مسیرهای MAPK و PI3k/Akt و فعالیت‌های NF-kB و STAT3 برای سرکوب بیان MMP-2/-9 و uPA و انسداد رگ‌زایی به طور مؤثری از تهاجم و متاستاز کارسینوم سلولی کبدی جلوگیری می‌کنند [۲۵]. عصاره متانولی زنجبیل دارای یک فعالیت بازدارنده بسیار مهم در برابر سلول‌های سرطانی کبد (HePG2) و سلول‌های سرطان سینه (MCF7)



### افق دانش

تصویر ۲. درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰.۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل در ساعات ۲۷، ۴۲، ۸۴ و ۲۷

الف: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار بیان می‌کند؛ ب: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار بیان می‌کند؛ ج: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار بیان می‌کند ( $P < 0.05$ ).



### افتخ دانش

تصویر ۳. درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۰.۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زنجبیل در ۴۲ و ۸۴ ساعت به طور معنی‌داری کاهش یافت.

الف: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار بیان می‌کند؛ ب: تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار بیان می‌کند ( $P < 0.05$ ).

دز و زمان در تعداد سلول‌های سرطانی تخمدان تحت درمان با 10-gingerol را گزارش کردند. کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی با افزایش درصد سلول‌ها در فاز G2 چرخه سلولی و کاهش درصد سلول‌ها در مرحله G1 همراه بود. سلول‌های سرطانی تخمدان کاهش بیان سیکلین B1، A، و D3 را پس از قرار گرفتن در معرض 10-gingerol نشان دادند [۳۰]. در مطالعه دیگری که روی سلول‌های سرطانی تخمدان انجام شد، رشد سلول‌های رده سلولی SKOV-3 به طور معنی‌داری توسط عصاره زنجبیل مهار شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن Bcl-2 پس از تیمار با عصاره زنجبیل بیش از ۰/۴ برابر کاهش یافت و سطح بیان ژن P53 در سلول‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل نسبت به گروه کنترل حدود ۷ برابر افزایش یافت. بنابراین محققان به این نتیجه رسیدند که ژن P53 با حذف ژن Bcl-2 باعث تحریک آپوپتوز می‌شود [۳۱].

نتایج این مطالعه تحقیقات قبلی در مورد عصاره زنجبیل به عنوان یک ماده گیاهی مؤثر ضدسرطان و تأثیر آن را بر روی رده سلولی A2780s را تایید کرد.

### نتیجه‌گیری

عصاره زنجبیل دارای اثر مهار بر بقای سلول‌های سرطانی تخمدان A2780s، به شکل وابسته به دز و وابسته به زمان است. همچنین بیان ژن SORT1 را در سلول‌های A2780s کاهش می‌دهد. مطالعه حاضر تحقیقات قبلی را تأیید می‌کند و این نوید را می‌دهد که عصاره زنجبیل بر سلول‌های سرطانی تخمدان و رده سلولی A2780s اثر سمی دارد و از این ترکیب می‌توان برای

مهارکننده‌های رشد و تعدیل‌کننده‌های مولکول‌های لنتوزایی و رگ‌زایی ۲-Agiopietin, VEGF-A, VEGF-C, Nrp2 و PDGF-B, KDR, SERPIN1, poietin-2, PDGF-B, SERPIN1 نشان دادند که در پیشرفت متاستاتیک سرطان پستان نقش دارند [۲۷].

لیانگ و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کرد که 6-Shogaol باعث افزایش تولید ROS، افزایش بیان Bax، 3 و Caspase9 و کاهش بیان Bcl-2، cyclin D1، PCNA، IL-6، JAK، و 6-Shogaol در سلول‌های سرطانی تخمدان شد. آن‌ها نشان دادند که 6-Shogaol با مهار انتقال STAT-3 در سلول‌های سرطانی تخمدان و مهار رشد سلول‌های سرطانی تخمدان باعث آپوپتوز می‌شود [۲۱]. در یک مطالعه بر روی zerombon ترکیب دیگری که در زنجبیل یافت شد، نتایج نشان داد که zerombone با تحریک آپوپتوز بهتر از سیسپلاتین باعث مرگ سلولی در رده‌های سلولی سرطان تخمدان و دهانه رحم می‌شود. zerombon چرخه سلولی را در مرحله G2/M به روشی وابسته به دز مهار می‌کند و به طور معنی‌داری سطح ترشح IL-6 را در رده‌های سلولی Caov-3 و HeLa کاهش می‌دهد [۲۸]. راد و همکاران نشان داد که زنجبیل به طور انتخابی از رشد سلول‌های سرطانی تخمدان در مقایسه با سلول‌های اپیتلیال طبیعی تخمدان جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، زنجبیل محصولات ژن تنظیم‌کننده NF-kB از جمله IL-8 و VEGF را که در تکثیر سلولی و رگ‌زایی سلولی نقش دارند، مهار می‌کند. با توجه به نتایج این مطالعه، 6-Shogaol فعال‌ترین ماده زنجبیل است که در سلول‌های سرطان تخمدان آزمایش شده است [۲۹]. در مطالعه دیگری، محققان کاهش وابسته به

تولید داروهای ضدسرطان تخمدان استفاده کرد.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در آزمایشگاه سلولی و رشدی گروه علوم پایه دانشکده علوم دامپزشکی دانشگاه اردکان (کد اخلاقی IR.YAZD. REC.1399.035) انجام شد.

### حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه مسئول آزمایشگاه دانشگاه اردکان جناب آقای محسن رشیدی تقدیر و تشکر کنند.

## References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015; 65(1):5-29. [DOI:10.3322/caac.21254] [PMID]
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2012; 62(1):10-29. [DOI:10.3322/caac.20138] [PMID]
- [3] Arab M, Khayamzadeh M, Mohit M, Hosseini M, Anbiaee R, Tabatabaeifar M, et al. Survival of ovarian cancer in Iran: 2000-2004. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2009; 10(4):555-8. [PMID]
- [4] Kurman RJ, Shih IM. Pathogenesis of ovarian cancer. Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2008; 27(2):151-60. [DOI:10.1097/PGP.0b013e318161e4f5] [PMID] [PMCID]
- [5] Zhao H, Yang Z, Wang X, Zhang X, Wang M, Wang Y, et al. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of e-cadherin. *Experimental & Molecular Medicine*. 2012; 44(11):633-41. [DOI:10.3858/emm.2012.44.11.072] [PMID] [PMCID]
- [6] Pawlik P, Mostowska A, Lianeri M, Sajdak S, Kędzia H, Jagodzinski PP. Folate and choline metabolism gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Molecular Biology Reports*. 2012; 39(5):5553-60. [DOI:10.1007/s11033-011-1359-0] [PMID]
- [7] Permeth-Wey J, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Cancer Epidemiology*. 2009; 472:413-37. [DOI:10.1007/978-1-60327-492-0\_20] [PMID]
- [8] Petersen CM, Nielsen MS, Nykjær A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(6):3599-605. [DOI:10.1074/jbc.272.6.3599] [PMID]
- [9] Donniger H, Bonome T, Radonovich M, Pise-Masison CA, Brady J, Shih JH, et al. Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene*. 2004; 23(49):8065-77. [DOI:10.1038/sj.onc.1207959] [PMID]
- [10] Amiri H, Mohammadi M, Sadatmand S, Taheri E. [Study the chemical composition of essential oil of ginger (*Zingiber officinale*) and antioxidant and cell toxicity (Persian)]. *Journal of Medicinal Plants*. 2016; 2(58):89-98. [DOR:20.1001.1.2717204.2016.15.58.14.2]
- [11] Rehman R, Akram M, Akhtar N, Jabeen Q, Shah SA, Ahmed K, et al. *Zingiber officinale* Roscoe (pharmacological activity). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(3):344-8. [https://www.researchgate.net/publication/265990258\\_Zingiber\\_officinale\\_Roscoe\\_pharmacological\\_activity#:~:text=Zingiber%20officinale%20is%20used%20as,hyperlipidemic%20and%20anti%20Demetic%20actions](https://www.researchgate.net/publication/265990258_Zingiber_officinale_Roscoe_pharmacological_activity#:~:text=Zingiber%20officinale%20is%20used%20as,hyperlipidemic%20and%20anti%20Demetic%20actions).
- [12] Moheghi N, Afshari JT, Brook A. [The cytotoxic effect of zingiber officinale in breast cancer (MCF7) cell line (Persian)]. *The Horizon of Medical Sciences*. 2011; 17(3):28-34. <http://hms.gmu.ac.ir/article-1-1282-en.html>
- [13] Rahman S, Salehin F, Iqbal A. Retraction: In Vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12:206. [DOI:10.1186/1472-6882-12-206] [PMID] [PMCID]
- [14] Lantz RC, Chen G, Sarihan M, Solyom A, Jolad S, Timmermann B. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2007; 14(2-3):123-8. [DOI:10.1016/j.phymed.2006.03.003] [PMID]
- [15] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research*. 2000; 60(5):1306-11. [PMID]
- [16] Abdullah S, Abidin SA, Murad NA, Makpol S, Ngah WZ, Yusof YA. Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *African Journal of Biochemistry Research*. 2010; 4(5):134-42. <https://academicjournals.org/journal/AJBR/article-abstract/A5B217C1349>
- [17] Nigam N, Bhui K, Prasad S, George J, Shukla Y. [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 181(1):77-84. [DOI:10.1016/j.cbi.2009.05.012] [PMID]
- [18] El-Sayeh NE, Elsaadany S, Elmassy R, Hefnawy H. Cytotoxic effect of ginger root (*Zingiber officinale*) on liver and breast cancer. *Zagazig Journal of Agricultural Research*. 2018; 45(3):995-1001. [DOI:10.21608/zjar.2018.49149]
- [19] Liu CM, Kao CL, Tseng YT, Lo YC, Chen CY. Ginger phytochemicals inhibit cell growth and modulate drug resistance factors in docetaxel resistant prostate cancer cell. *Molecules*. 2017; 22(9):1477. [DOI:10.3390/molecules22091477] [PMID] [PMCID]
- [20] Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PloS One*. 2012; 7(12):e53178. [DOI:10.1371/journal.pone.0053178] [PMID] [PMCID]
- [21] Liang T, He Y, Chang Y, Liu X. 6-shogaol a active component from ginger inhibits cell proliferation and induces apoptosis through inhibition of STAT-3 translocation in ovarian cancer cell lines (A2780). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019; 24(3):560-7. [DOI:10.1007/s12257-018-0502-3]
- [22] Asadi T, Zanguee N, Mousavi SM, Zakeri M, Batvandi Z. [Antimicrobial effects of Alcoholic extract of *Zingiber officinale* on some pathogen bacteria of aquatic organisms (Persian)]. *Journal of Applied Ichthyological Research*. 2015; 3(2):59-68. <http://jair.gonbad.ac.ir/article-1-82-en.html>
- [23] 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 335(2):300-8. [DOI:10.1016/j.bbrc.2005.07.076] [PMID]
- [24] Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. The role of chalcones in suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology*. 2011; 11(3):295-309. [DOI:10.1016/j.intimp.2010.12.006] [PMID] [PMCID]
- [25] Weng CJ, Chou CP, Ho CT, Yen GC. Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2012; 56(8):1304-14. [DOI:10.1002/mnfr.201200173] [PMID]
- [26] Al-Amin M, Eltayeb NM, Hossain CF, Khairuddean M, Rahiman SSF, Salhimi SM. Inhibitory activity of extract, fractions, and compounds from zingiber montanum rhizomes on the migration of breast cancer cells. *Planta Medica*. 2020; 86(06):387-94. [DOI:10.1055/a-1129-7026] [PMID]

- [27] Nanchari SR, Perugu S, Venkatesan V. Molecular docking studies to understand the potential role of ginger compounds (6-gingerol and 6-shogaol) on anti-angiogenic and anti-lymphangiogenic mechanisms. *International Journal of Chemistry*. 2020; 12(1):61-8. [DOI:10.5539/ijc.v12n1p61]
- [28] Abdelwahab SI, Abdul AB, Zain ZNM, Hadi AHA. Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells. *International Immunopharmacology*. 2012; 12(4):594-602. [DOI:10.1016/j.intimp.2012.01.014] [PMID]
- [29] Rhode J, Fogoros S, Zick S, Wahl H, Griffith KA, Huang J, et al. Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC complementary and Alternative Medicine*. 2007; 7(1):1-9. [DOI:10.1186/1472-6882-7-44] [PMID] [PMCID]
- [30] Rasmussen A, Murphy K, Hoskin DW. 10-Gingerol inhibits ovarian cancer cell growth by inducing G2 arrest. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019; 9(4):685-9. [DOI:10.15171/apb.2019.080] [PMID] [PMCID]
- [31] Pashaei-Asl R, Pashaei-Asl F, Gharabaghi PM, Khodadadi K, Ebrahimi M, Ebrahimi E, et al. The inhibitory effect of ginger extract on ovarian cancer cell line: Application of systems biology. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017; 7(2):241-9. [DOI:10.15171/apb.2017.029] [PMID] [PMCID]