**مجله دانشکده پزشکی اصفهان**
**سال سی و سوم/شماره ۳۳۱/هفته سوم خرداد ماه ۱۳۹٤**

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۳/۱۲/۲
**تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۴/۱/۲۹

# بررسی اثر مهار کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه بر روی آنژیوژنز تومور ملانوما از طریق گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ در موش‌های C۵۷LB۶

دکتر سیما سیف‌آبادی[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]

**مقاله پژوهشی**

## چکیده

**مقدمه:** آنژیوژنز فرایند تشکیل عروق خونی جدید از عروق قبلی می‌باشد و در رشد و متاستاز تومور نقش حیاتی دارد. این مطالعه، با هدف بررسی اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی هیدروالکلی انار پوست سیاه در مدل حیوانی ملانوما انجام شد.

**روش‌ها:** عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه با استفاده از حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک تهیه گردید. $۱ \times ۱۰^{۶}$ سلول ملانوما به همه‌ی موش‌ها در روز صفر مطالعه به صورت زیر جلدی تزریق شد. در روز هفتم مطالعه، موش‌ها به ۹ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه شاهد آب مقطر دریافت نمود. گروه‌های دوم تا پنجم به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی استاندارد را دریافت نمودند. گروه ششم عصاره را به همراه آنتاگونیست PPAR-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (۵ mg/kg) دریافت نمود. گروه هفتم عصاره را به همراه آنتاگونیست PPAR-α (۱۰ mg/kg) دریافت نمود. گروه هشتم و نهم نیز فنوفیبرات (۱۰۰ mg/kg) و روزیگلیتازون (۱۰۰ mg/kg) را به عنوان آگونیست‌های PPAR دریافت نمودند. در این مطالعه، اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه در مدل موش ملانوما بررسی شد. در روز ۱۶ مطالعه، موش‌ها کشته شدند و نمونه‌ی تومور آن‌ها وزن گردید و به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی CD ۳۱ آنالیز شد.

**یافته‌ها:** عصاره‌ی پوست انار به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش میزان آنژیوژنز و وزن تومور شد ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین میزان آنژیوژنز و وزن تومور در گروه‌هایی که آنتاگونیست PPAR به همراه عصاره دریافت کردند، بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به تنهایی بود ($P < ۰/۰۰۱$). میزان آنژیوژنز و وزن تومور در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود ($P < ۰/۰۵۰$).

**نتیجه‌گیری:** عصاره‌ی پوست انار در درمان سرطان ملانوما نقش به‌سزایی دارد و اثر ضد آنژیوژنز عصاره‌ی پوست انار از طریق فعال نمودن مسیر PPAR-α و PPAR-γ صورت می‌گیرد.

**واژگان کلیدی:** ملانوما، عصاره‌ی پوست انار،آنژیوژنز، Peroxisome proliferator-activated receptor

**ارجاع:** سیف‌آبادی سیما، حق‌جوی جوانمرد شقایق. **بررسی اثر مهار کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه بر روی آنژیوژنز تومور ملانوما از طریق گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ در موش‌های C۵۷LB۶.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۱): ۵۴۵-۵۳۶

## مقدمه

ملانوما نوعی سرطان پوست متاستاتیک می‌باشد که پیش‌آگهی ضعیفی دارد و نوعی از بدخیمی است که در هر دو جنس زن و مرد در حال افزایش است و شیمی درمانی و اشعه درمانی تأثیر زیادی بر بهبود آن نداشتند (۱). با وجود پیشرفت‌های اخیر در درمان

۱- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: shaghayegh.haghjoo@gmail.com

سرطان، میزان مرگ و میر در این بیماری بر اثر درمان‌های موجود کاهش نیافته است که این امر، نیاز به ایجاد روش‌های درمانی جدیدتر را آشکار می‌سازد (۲). یکی از این روش‌های درمانی جدید، شناسایی عوامل مولکولی مختص به این بیماری است. مسیرهای سیگنالی متعددی به منظور یافتن درمان‌های جدیدتر و اختصاصی‌تر برای سرطان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مسیر PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) یکی از جدیدترین مسیرهای سیگنالی است. گیرنده‌های PPAR عوامل نسخه‌برداری فعال شده توسط لیگاند هستند و شامل سه ایزوفرم α، β و γ هستند (۳). مطالعات اخیر نشان داده است که آگونیست‌های PPAR-α و همچنین PPAR-γ باعث مهار رشد چندین رده‌ی سلول سرطانی شده‌اند (۴). به طور کلی، پیشنهاد شده است که مسیر PPAR در بهبود ملانوما نقش به‌سزایی دارد (۵).

آنژیوژنز، فرایند تشکیل عروق جدید از عروق قبلی می‌باشد که یک فرایند لازم در فیزیولوژی است و در حالت عادی توسط تعادل میان عوامل بازدارنده و عوامل القا کننده تنظیم می‌شود. در صورت بر هم خوردن این تعادل، بیماری به وجود می‌آید که در این صورت، مهار آنژیوژنز یک روش درمانی محسوب می‌شود (۷-۶).

مطالعات نشان داده است که تومور ملانوما برای رشد و متاستاز به تشکیل عروق جدید نیاز دارد و گسترش آنژیوژنز در ملانوما با پیش‌آگهی ضعیف این بیماری، کاهش مدت بقای بیمار و همچنین افزایش سرعت عود بیماری همراه بوده است (۹-۸). CD۳۱ پروتئینی است که در سطح سلول‌های اندوتلیال قرار گرفته است و در تومورهای بدخیم به میزان زیادی بیان می‌گردد و بنابراین برای بررسی میزان آنژیوژنز تومور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰).

گیاهان از زمان‌های گذشته تاکنون برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به مصرف گسترده‌ی ترکیبات طبیعی در جوامع مختلف به دلیل عوارض جانبی کمتر، ترکیبات ضد آنژیوژنز با منشأ طبیعی از اهمیت زیادی برخوردار شده‌اند (۱۱). به دلیل پی بردن به نقش رگ‌زایی در گسترش بیماری سرطان، ترکیبات دارای اثرات ضد رگ‌زایی اهمیت زیادی یافتند و تاکنون گیاهان متعددی با اثرات ضد آنژیوژنز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و حتی برخی از ترکیبات مؤثر آن‌ها شناسایی و جداسازی شده‌اند (۱۲-۱۱).

انار با نام علمی Punica granatum و نام انگلیسی Pomegranate متعلق به خانواده‌ی Punicaceae می‌باشد. عصاره‌ی حاصل از تمام بخش‌های انار دارای خواص درمانی می‌باشد (۱۳). ترکیبات شیمیایی موجود در انار شامل سه دسته‌ی اصلی آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشند. آنتوسیانین‌های موجود در پوست انار شامل سیانیدین، دلفینیدین و پلارگونیدین ،تانن‌های موجود شامل پونیکالین و پونیکالاژین و کاتکین ترکیب فنولی موجود در پوست انار می‌باشد (۱۴).

در مطالعات گوناگون اثرات مفید انار در درمان سرطان‌های روده‌ی بزرگ، پروستات، پستان و ریه مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳). به علاوه، شواهدی مبنی بر اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی انار وجود دارد (۱۵). به عنوان مثال، مشاهده شده است که برخی از ترکیبات موجود در انار مانند فلاونوئیدهای شبه استروژنی، خواص آنتی‌آنژیوژنیک

دارند و یا این که آنژیوژنز را از طریق پایین آوردن عوامل محرک آن، مهار می‌کنند (۱۷-۱۶، ۱۳).

با توجه به این که تومور ملانوما برای رشد و متاستاز به آنژیوژنز وابسته می‌باشد، یافتن رویکردی درمانی که بتواند از طریق مهار رگ‌زایی تومور از رشد و متاستاز آن جلوگیری نماید، مد نظر می‌باشد.

با توجه به مطالب پیش‌گفته، در این مطالعه تأثیر عصاره‌ی پوست خارجی و داخلی انار بر میزان آنژیوژنز تومور سرطانی و همچنین مکانیسم اثر آن از طریق گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ در مدل حیوانی بررسی شد.

## روش‌ها

در این مطالعه عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار همراه با اسید استیک جهت استخراج مؤثر آنتوسیانین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، انار شیرین پوست سیاه یزد از گونه‌ی Punicaceae از کلکسیون باغ انار مرکز تحقیقات کشاورزی منطقه‌ی دستگرد اصفهان تهیه و نام علمی آن توسط همین مؤسسه تأیید شد. سپس پوست انارها کنده شد و پودر یکنواختی از پوست خشک شده‌ی آن‌ها تهیه گردید. ۵۰ g گرم پودر پوست خشک انار با ۱۰۰ ml حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک مخلوط شد و عمل به هم زدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ $^{o}C$ ادامه داشت.

سپس عصاره‌ی به دست آمده با کاغذ صافی و تحت خلأ صاف شد. جهت خارج کردن حلال‌های آن توسط دستگاه Eppendorf concentrator، تحت خلأ قرار داده شد و با دمای ۶۰ $^{o}C$ حلال‌های آن تبخیر شد. در ادامه، جهت آماده‌سازی عصاره، عصاره‌ی به دست آمده از مرحله‌ی قبل به طور جداگانه درون ویال‌های متعدد ریخته شد و این ویال‌ها جهت پودر شدن در فرایند عصاره‌گیری به مدت ۲۴ ساعت داخل دستگاه فریزدرای منتقل گردید. پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای $-۸۰^{o}C$ نگهداری شد (۱۹-۱۸).

برای انجام این مطالعه، تعداد ۷۲ موش C۵۷LB۶ با سن ۸-۶ هفته به طور تصادفی به ۹ گروه ۸تایی تقسیم شدند. به همه‌ی موش‌ها در روز صفر مطالعه $۱ \times ۱۰^{۶}$ سلول ملانوما به صورت زیر جلدی تزریق شد و موش‌ها به مدت ۱۶ روز تیمار شدند.

از روز هفتم مطالعه، گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و ۱ ml آب مقطر (حلال عصاره) دریافت نمود. گروه دوم تا پنجم به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ mg/kg را از طریق خوراکی دریافت نمودند. گروه ششم دوز ۴۰۰ را به همراه GW۶۴۷۱ ۱۰ mg/kg (آنتاگونیست PPAR-α) حل شده در Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) به صورت داخل صفاقی دریافت نمود و گروه هفتم دوز ۴۰۰ mg/kg را به همراه T۰۰۷۰۹۰۷ ۵ mg/kg (آنتاگونیست PPAR-γ) حل شده در DMEM به صورت داخل صفاقی دریافت نمود (۲۱-۲۰). علت استفاده از دوزهای متعدد عصاره، بررسی رابطه‌ی دوز- پاسخ می‌باشد. گروه هشتم و نهم نیز فنوفیبرات (۱۰۰ mg/kg) و روزیگلیتازون (۱۰۰ mg/kg) را به ترتیب به عنوان آگونیست‌های PPAR-α و PPAR-γ دریافت نمودند.

موش‌ها هر روز از جهت وجود توده‌ی قابل لمس در محل تزریق بررسی شدند. موش‌ها در روز ۱۶ مطالعه توسط سدیم پنتوباربیتال بیهوش شدند. سپس

حیوان لاپاراتومی و تومور جدا و توزین شد و در فرمالین ۱۰ درصد برای آزمایش های بعدی ثابت نگه داشته شد.

ارزیابی آنژیوژنز با ایندکس CD۳۱ به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام پذیرفت که در آن از آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن CD۳۱ استفاده شد. بافت‌ها در ضخامت ۴ µ برش داده شدند و روی لام قرار گرفتند. پس از پارافین‌زدایی با Xylene و دهیدراته شدن با الکل، لام‌ها با آنتی‌بادی اولیه‌ی مونوکولونال بر ضد آنتی‌بادی مونوکلونال CD۳۱ (Dako) و رقت ۱:۱۰۰ به مدت نیم ساعت انکوبه شدند. در مرحله‌ی بعدی لام‌ها با بافر تریس به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، از محلول (DAB Diaminobenzidine) جهت کروموژن استفاده شد و لام‌ها با این کروموژن به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. جهت حذف مواد ناخواسته از لام‌ها، بار دیگر شستشو با آب جاری انجام شد.

در پایان، مقاطع بافتی در زیر میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شدند و سلول‌های اندوتلیال رنگ شده با CD۳۱ در ۱۰ فیلد انتخابی به صورت تصادفی از هر نمونه‌ی بافتی شمارش گردید. تراکم مویرگی (Capillary density) یا به عبارت دیگر آنژیوژنز به صورت تعداد مویرگ‌ها در هر میلی‌متر مربع گزارش شد.

در پایان، نتایج اندازه‌گیری متغیرها با استفاده از آزمون One-way analysis of variance (One-way ANOVA) و پس آزمون Tukey با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بین گروه‌ها مقایسه شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

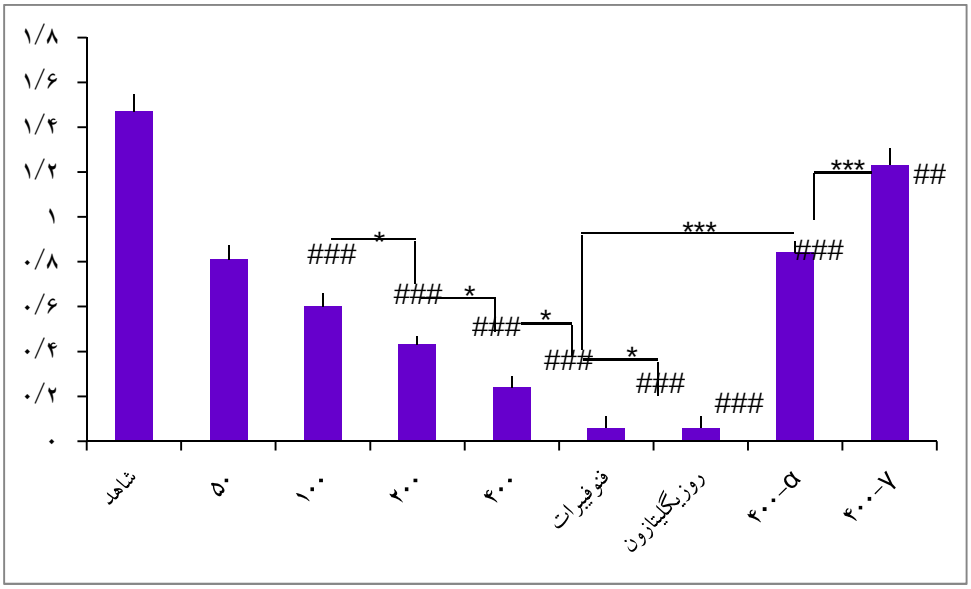
## یافته‌ها

### *وزن تومور*

وزن تومور در گروه شاهد بیشتر از بقیه‌ی گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵۰$) و با افزایش دوز از ۵۰ mg/kg به ۴۰۰ به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۵۰$). وزن تومور در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست‌ها بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به تنهایی بود ($P < ۰/۰۰۱$). به علاوه، وزن تومور در گروه دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست PPAR-γ بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست PPAR-α بود ($P < ۰/۰۰۱$). وزن تومور در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل ۱).

### *تراکم مویرگی*

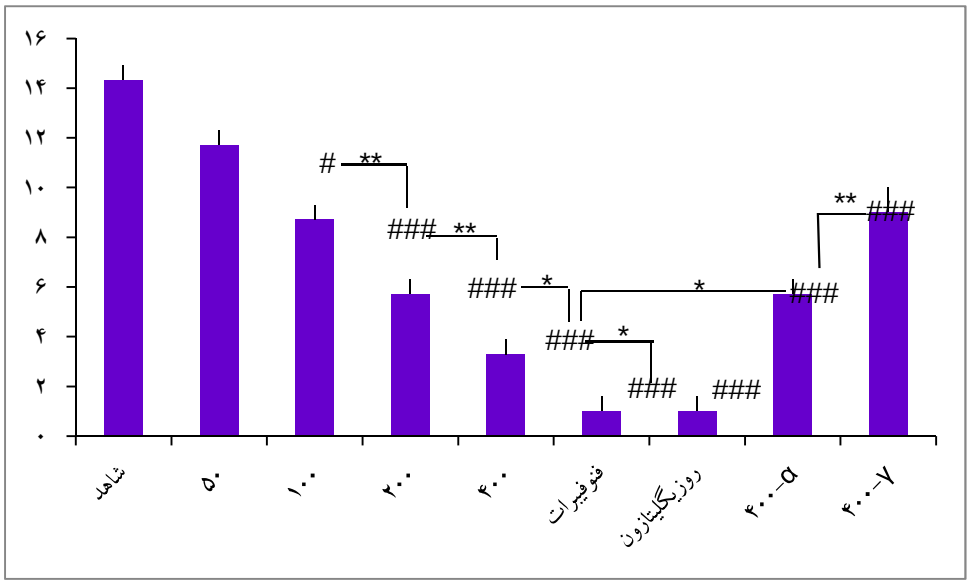
تراکم مویرگی در گروه شاهد بیشتر از بقیه‌ی گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵۰$) و با افزایش دوز از ۵۰ mg/kg به ۴۰۰ به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۱۰$). تراکم مویرگی در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست‌ها بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به تنهایی بود ($P < ۰/۰۰۱$). به علاوه، تراکم مویرگی در گروه دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست PPAR-γ بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست PPAR-α بود ($P < ۰/۰۰۱$). تراکم مویرگی در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل‌های ۲ و ۳).




شکل ۱. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوز mg/kg ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ بر وزن تومور در پایان مطالعه

علامت مربع اختلاف معنی‌دار سایر گروه‌ها را در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. $P < ۰/۰۵۰$ با نماد #، $P < ۰/۰۱۰$ با نماد ## و $P < ۰/۰۰۱$ با نماد ### نشان داده می‌شود.

علامت ستاره اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. $P < ۰/۰۵۰$ با نماد *، $P < ۰/۰۱۰$ با نماد ** و $P < ۰/۰۰۱$ با نماد *** نشان داده می‌شود. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

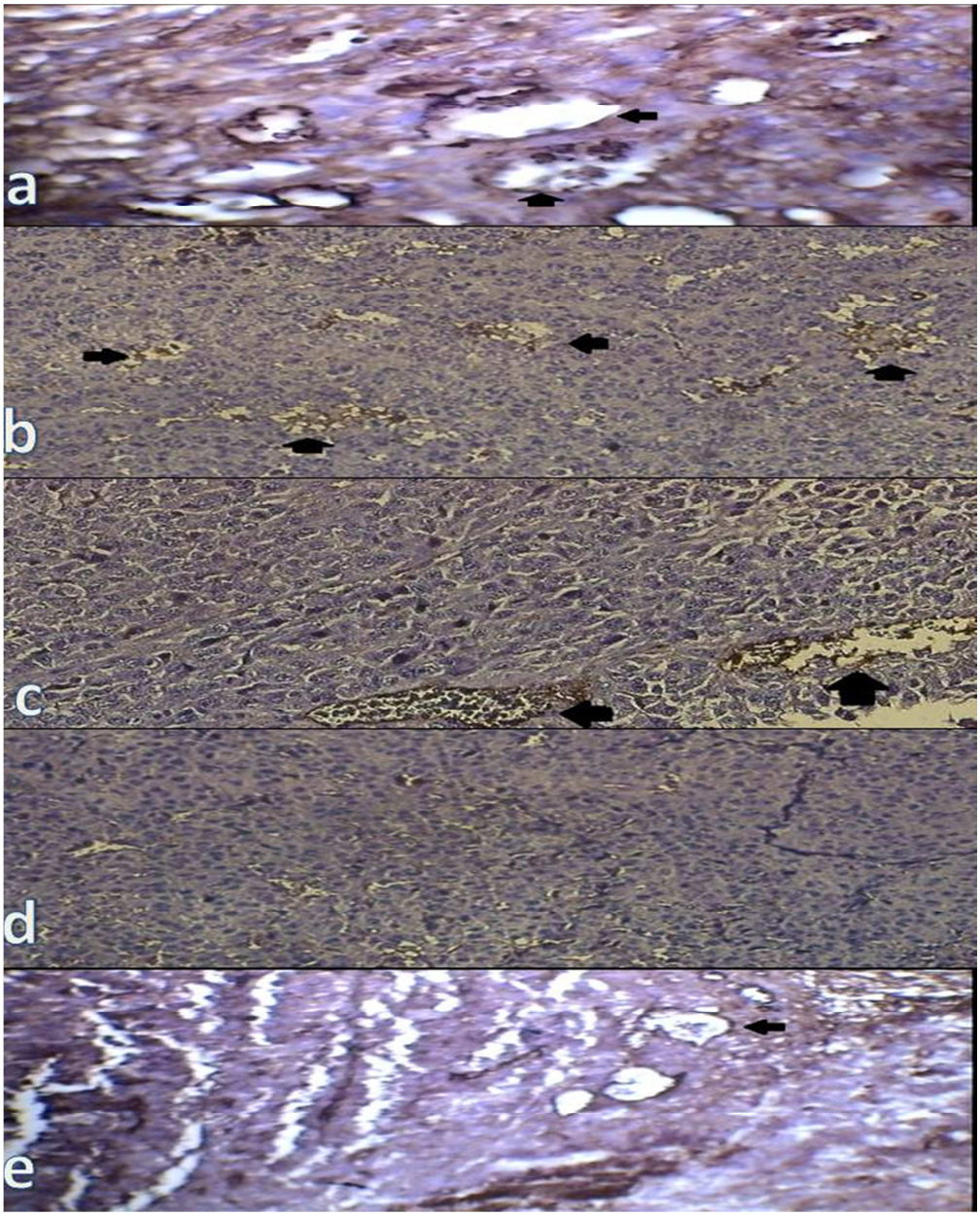



شکل ۲. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوز mg/kg ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ بر تراکم مویرگی

علامت مربع اختلاف معنی‌دار سایر گروه‌ها را در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. $P < ۰/۰۵۰$ با نماد #، $P < ۰/۰۱۰$ با نماد ## و $P < ۰/۰۰۱$ با نماد ### نشان داده می‌شود.

علامت ستاره اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. $P < ۰/۰۵۰$ با نماد *، $P < ۰/۰۱۰$ با نماد ** و $P < ۰/۰۰۱$ با نماد *** نشان داده می‌شود.

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.




**شکل ۳. تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰. a، b، c، d و e به ترتیب مربوط به گروه شاهد، دوز mg/kg ۲۰۰، دوز mg/kg ۴۰۰، فنوفیبرات و گروه دریافت کننده‌ی آنتاگونیست به همراه عصاره می‌باشد. مویرگ‌ها با فلش نشان داده شده‌اند. همان‌گونه که در تصویر ملاحظه می‌کنید، تعداد مویرگ‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره کاهش یافته است و در گروه دریافت کننده‌ی فنوفیبرات تراکم مویرگی کمترین مقدار را دارد.**

## بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره‌ی پوست انار به طور معنی‌داری در کاهش میزان آنژیوژنز و وزن تومور تأثیر دارد. انار در همه‌ی دوزهای استفاده شده به طور معنی‌داری باعث کاهش تراکم مویرگی و وزن تومور شد و با افزایش دوز، میزان آنژیوژنز کاهش بیشتری یافت، اما وزن تومور و میزان آنژیوژنز در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون

کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود. از آن جا که مهار نمودن گیرنده‌های PPAR-γ و PPAR-α منجر به افزایش وزن و میزان آنژیوژنز تومور شد، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی پوست انار از طریق فعال نمودن این دو گیرنده عمل می‌نماید. با این وجود، فنوفیبرات و روزیگلیتازون به عنوان آگونیست‌های PPAR-γ و PPAR-α بیشترین اثر را در کاهش وزن تومور و میزان آنژیوژنز داشتند.

مطالعات دیگر به اثرات آنتی‌آنژیوژنیک پلی‌فنول‌های پوست انار اشاره نموده‌اند. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که توسط Toi و همکاران انجام شد، پلی‌فنول‌های موجود در پوست، آب تخمیر شده و روغن هسته‌ی انار منجر به کاهش تکثیر سلول‌های آنژیوژنیک از جمله سلول اندوتلیال ورید بند ناف انسان و کاهش بیان عامل محرک رشد عروقی در سلول‌های سرطان پستان و سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان گردید و همچنین موجب مهار آنژیوژنز در محیط In vitro و در پرده‌ی کوریوآلانتوئیک جوجه به عنوان محیط In vivo شدند (۲۲). همچنین در مطالعه‌ای که توسط دانا و همکاران انجام شد، عصاره‌ی پوست انار سیاه یزد به صورت وابسته به دوز موجب کاهش آنژیوژنز در مدل استاندارد آزمایشگاهی In vitro شد. به این صورت که موجب کاهش معنی‌دار طول، اندازه و تعداد انشعاب تیوب‌ها بر روی ماتریژل شد (۲۳).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Sartippour و همکاران صورت گرفت، عصاره‌ی غنی از پلی‌فنول حاصل از پوست و میوه‌ی انار منجر به کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان در محیط In vitro گردید و همچنین در مدل حیوانی، سرطان پروستات منجر به کاهش رشد و میزان آنژیوژنز و همچنین، کاهش بیان عامل محرک رشد عروقی گردید (۲۴).

علاوه بر مکانیسم بررسی شده در این مطالعه، ترکیبات موجود در پوست انار از طریق سایر مکانیسم‌ها از جمله القای آپوپتوز با مهار چرخه‌ی سلولی و یا ایجاد اختلال در غشای میتوکندری و یا فعال‌سازی مسیر Caspase-۳ و همچنین با مهار آنزیم‌های مؤثر در سرطان سینه از جمله آروماتاز (آنزیم سنتز کننده‌ی استروژن) و ۱۷- بتا- هیدروکسی استروئید دهیدروژناز ۱ (آنزیم تبدیل کننده‌ی استرون به ۱۷- بتا استرادیول) موجب مهار پیشرفت سرطان می‌شوند (۲۶-۲۵).

در این مطالعه، فنوفیبرات و روزیگلیتازون در مقایسه با عصاره‌ی پوست انار، بیشترین تأثیر را در مهار آنژیوژنز نشان دادند که این امر به فعال نمودن اختصاصی گیرنده‌های آن‌ها مربوط می‌باشد (۲۸-۲۷، ۴). گیرنده‌های PPAR-γ در سرطان‌های متعددی بیان می‌شوند و آگونیست‌های این گیرنده، منجر به مهار آنژیوژنز از طریق مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌شوند (۴). همچنین، آگونیست‌های PPAR-α از جمله فنوفیبرات از طریق مهار آنژیوژنز موجب مهار رشد تومور می‌گردند و اثرات آنتی‌آنژیوژنیک فنوفیبرات به صورت اختصاصی به فعال نمودن این گیرنده مربوط می‌شود (۲۸-۲۷).

به طور کلی، مطالعات اخیر مسیر PPAR را به عنوان هدف درمانی جدید معرفی نموده‌اند (۴). در این مطالعه نشان داده شد که عصاره‌ی پوست انار از طریق گیرنده‌های PPAR-γ و PPAR-α بخشی از اثر آنتی‌آنژیوژنز خود را اعمال می‌نماید.

پوست انار غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و تانن‌هایی از جمله الاژی تانن، پونیکالاژین و پونیکالین است (۲۹). مطالعات بسیاری نشان داده است که پلی‌فنول‌های موجود در سایر گیاهان قابلیت مهار آنژیوژنز را دارند (۳۱-۳۰). تصور بر این است که عصاره‌ی پوست انار نیز از طریق پلی‌فنول‌هایش اثر آنتی‌آنژیوژنیک ایجاد می‌کند. علاوه بر این، پوست و آب انار حاوی مقادیر فراوانی از فلاونوئیدهای استروژنی مانند لوتئولین می‌باشد که در مطالعات دیگر ثابت گردیده است که اثر مهار کننده‌ی آنژیوژنز دارد و یا عوامل القا کننده‌ی آنژیوژنز را مهار می‌نماید (۱۷-۱۶). به طور دقیق مشخص نیست که کدام یک از اجزای موجود در پوست انار، مسؤول اثر مشاهده شده است. اما مطالعات مختلف به اثرات هم‌افزایی ترکیبات موجود در انار اشاره نموده‌اند (۳۲). از این رو می‌توان نتیجه گرفت که اثرات آنتی‌آنژیوژنیک مشاهده شده، در نتیجه‌ی اثرات هم‌افزایی بین ترکیبات مختلف موجود در پوست انار می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

عصاره‌ی پوست انار به صورت وابسته به دوز، منجر به کاهش آنژیوژنز و وزن تومور در مدل حیوانی سرطان ملانوما می‌شود و بخشی از این تأثیر از طریق فعال نمودن گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی مصوب مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی به شماره‌ی ۲۹۰۰۳۵ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بابت تأمین هزینه‌ی اجرای این طرح قدردانی می‌گردد.

## References

1. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. Oncologist 2011; 16(1): 5-24.
2. Oh SH, Woo JK, Jin Q, Kang HJ, Jeong JW, Kim KW, et al. Identification of novel antiangiogenic anticancer activities of deguelin targeting hypoxia-inducible factor-1 alpha. Int J Cancer 2008; 122(1): 5-14.
3. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 2002; 53: 409-35.
4. Yasui Y, Kim M, Tanaka T. PPAR ligands for cancer chemoprevention. PPAR Res 2008; 2008: 548919.
5. Freudlsperger C, Schumacher U, Reinert S, Hoffmann J. The critical role of PPARgamma in human malignant melanoma. PPAR Res 2008; 2008: 503797.
6. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med 2003; 3(7): 643-51.
7. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. Leukemia 2007; 21(1): 44-52.
8. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. Semin Oncol 2007; 34(6): 555-65.
9. Ribatti D, Nico B, Floris C, Mangieri D, Piras F, Ennas MG, et al. Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. Oncol Rep 2005; 14(1): 81-4.
10. Leong A, Cooper K, Leong JWM. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2003.
11. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 2. Curr Oncol 2006; 13(3): 99-107.
12. Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. Semin Oncol 2001; 28(6): 570-6.

13. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 2007; 109(2): 177-206.
14. Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 789764.
15. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Altern Med Rev 2008; 13(2): 128-44.
16. Fotsis T, Pepper MS, Montesano R, Aktas E, Breit S, Schweigerer L, et al. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1998; 12(4): 649-66.
17. Le ML. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. Biomed Pharmacother 2002; 56(6): 296-301.
18. Ni Q, Xu G, Lu G, Gao Q, Zhou C, Zhang Y. Investigation of the stability and antioxidant properties of anthocyanins-based purple potato colorants after processing. African Journal of Biotechnology 2012; 11(14): 3379-87.
19. Oancea S, Draghici O. pH and thermal stability of anthocyanin-based optimised extracts of Romanian red onion cultivars. Czech Journal of Food Science 2013; 31(3): 283-91.
20. Downer EJ, Clifford E, Amu S, Fallon PG, Moynagh PN. The synthetic cannabinoid R(+)WIN55,212-2 augments interferon-beta expression via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. J Biol Chem 2012; 287(30): 25440-53.
21. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. Cancer Sci 2008; 99(10): 1892-900.
22. Toi M, Bando H, Ramachandran C, Melnick SJ, Imai A, Fife RS, et al. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. Angiogenesis 2003; 6(2): 121-8.
23. Dana N, Haghjooy Javanmard S, Fazilati M. Anti-angiogenic effects of pomegranate peel extract (Punica Granatum L.) on human umbilical vein endothelial cells. J Isfahan Med Sch 2012; 30(195): 913-21. [In Persian].
24. Sartippour MR, Seeram NP, Rao JY, Moro A, Harris DM, Henning SM, et al. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. Int J Oncol 2008; 32(2): 475-80.
25. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food 2004; 7(3): 274-83.
26. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (Punica granatum) for human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 71(3): 203-17.
27. Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnes CM, Fannon M, et al. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(3): 985-90.
28. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A, Theocharis S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands: potential pharmacological agents for targeting the angiogenesis signaling cascade in cancer. PPAR Res 2008; 2008: 431763.
29. Christaki EV, Bonos EM, Florou-Paneri PC. Dietary benefits of pomegranates in humans and animals. Food, Agriculture and Environment 2011; 9(1): 142-4.
30. Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, et al. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. Clin Cancer Res 2004; 10(6): 2190-202.
31. Sartippour MR, Heber D, Zhang L, Beatty P, Elashoff D, Elashoff R, et al. Inhibition of fibroblast growth factors by green tea. Int J Oncol 2002; 21(3): 487-91.
32. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem 2005; 16(6): 360-7.

**Journal of Isfahan Medical School**
Received: 21.02.2015
**Vol. 33, No. 331, 3rd Week, June 2015**
Accepted: 18.04.2015

# The Inhibitory Effect of Hydroalcoholic Extract of Black Punica Granatum Pericarp on Melanoma Tumor Angiogenesis through PPARα and PPARγ Pathways in C57BL6 Mice

Sima Seifabadi PharmD[1], Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD[2]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Angiogenesis is the process of formation of new capillaries from the preexisting vessels and plays an important role in the growth and metastasis of tumor. In this study, we aimed to investigate the antiangiogenic effect of hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp extract (PPE) in the animal model of melanoma.

**Methods:** The hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp was prepared using 70% ethanol containing 1% acetic acid. $1 \times 10^6$ B16F10 melanoma cells were injected to all mice on the day 0, subcutaneously (s.c). On 7th day, mice were divided into 9 groups of 8 animals. The first group received distilled water. Groups second to fifth received 50, 100, 200 and 400 mg/kg of black pomegranate pericarp extract. The sixth group received the extract and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) antagonist (5 mg/kg/day). The seventh group received the extract and PPAR-α antagonist (10 mg/kg/day). Eighth and ninth groups received fenofibrate (100 mg/kg) and rosiglitazone (100 mg/kg) as agonists of PPAR-α and PPAR-γ, respectively. On 16th day, mice were euthanized and their tumor samples were weighed and then analyzed via immunohistochemistry staining for CD31.

**Findings:** The black pomegranate pericarp extract dose dependently decreased tumor weight and angiogenic marker ($P < 0.05$). Moreover, tumor weight and angiogenic marker in the groups which received both peroxisome proliferator-activated receptor antagonists and black pomegranate pericarp extract, was more than the group which received the extract ($P < 0.001$). Level of angiogenesis and tumor weight in the groups which received fenofibrate and rosiglitazone was less than the group that received the highest dose of pomegranate pericarp extract ($P < 0.05$).

**Conclusion:** Taken together, our observations suggest that black pomegranate pericarp extract may have potential implication in melanoma cancer treatment, and show that antiangiogenic effect of this extract may be mediated through modulation of peroxisome proliferator-activated receptor activation pathways.

**Keywords:** Melanoma, Pomegranate pericarp extract, Angiogenesis, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR)

**Citation:** Seifabadi S, Haghjooy-Javanmard Sh. **The Inhibitory Effect of Hydroalcoholic Extract of Black Punica Granatum Pericarp on Melanoma Tumor Angiogenesis through PPARα and PPARγ Pathways in C57BL6 Mice.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(331): 536-45

1- Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine AND Applied Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD, Email: shaghayegh.haghjoo@gmail.com