مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۳٤/هفته دوم تیر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۱۸

بررسی اثر مهار کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه بر روی تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از طریق گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ در موش‌های C۵۷BL۶

دکتر سیما سیف‌آبادی[۱]، لاله رفیعی[۲]، هاجر ناجی اصفهانی[۲]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، نقش مهمی در رشد و آنژیوژنز تومور ایفا می‌کنند. انار با نام علمی Punica granatum، متعلق به خانواده‌ی Punicaceae، در انواع سرطان‌ها خاصیت مهار کنندگی نشان داده است. در این مطالعه، اثر عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار بر تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در مدل موش مبتلا به سرطان ملانوما و همچنین مکانیسم اثر آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه با استفاده از حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک تهیه گردید. در روز صفر مطالعه، $۱۰^{۶} \times ۱$ سلول ملانومای B۱۶F۱۰ به هر یک از ۸۸ موش C۵۷BL۶ نر با وزن ۲۵ گرم به صورت زیر جلدی تزریق شد. در روز هفتم مطالعه، موش‌ها به طور تصادفی به ۱۱ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و آب مقطر دریافت نمود. گروه‌های دوم تا پنجم، از روز ۷ مطالعه به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی استاندارد را از طریق گاواژ دریافت نمودند. گروه ششم، عصاره را به همراه آنتاگونیست PPAR-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) داخل صفاقی دریافت نمود. گروه هفتم، عصاره را به همراه آنتاگونیست PPAR-α (Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha) داخل صفاقی دریافت نمود (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). گروه هشتم و نهم نیز فنوفیبرات (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روزیگلیتازون (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به ترتیب به عنوان آگونیست‌های PPAR-α و PPAR-γ از طریق گاواژ دریافت نمودند. گروه دهم و یازدهم نیز آنتاگونیست‌های PPAR را به تنهایی دریافت کردند. در روز ۱۶ مطالعه، موش‌ها کشته شدند و خون از قلب آن‌ها برای شمارش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به روش فلوسایتومتری گرفته شد. در فلوسایتومتری سلول‌های $CD۳۴^{+}/VEGFR۲^{+}$ شمارش شدند. مقادیر $P < ۰/۰۵۰$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره‌ی پوست انار به صورت وابسته به دوز، منجر به کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال شد ($P < ۰/۰۵۰$). تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در گروه‌هایی که آنتاگونیست PPAR به همراه عصاره دریافت کردند، بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به تنهایی بود ($P < ۰/۰۱۰$).

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی پوست انار در کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال مؤثر است و بخشی از این اثر، از طریق فعال نمودن مسیر PPAR صورت می‌گیرد.

واژگان کلیدی: ملانوما، عصاره‌ی پوست انار، سلول پیش‌ساز اندوتلیال، PPAR

ارجاع: سیف‌آبادی سیما، رفیعی لاله، ناجی اصفهانی هاجر، حق‌جوی جوانمرد شقایق. **بررسی اثر مهار کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه بر روی تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از طریق گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ در موش‌های C۵۷BL۶.**
مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۴): ۶۹۳-۶۸۵

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

مقدمه

ملانومای بدخیم، نوعی سرطان متاستاتیک و مهاجم با پیش‌آگهی ضعیف و بسیار مقاوم به درمان است که وقوع آن به سرعت در حال افزایش می‌باشد. میزان مرگ و میر ناشی از ملانوما در سال‌های اخیر، در مقایسه با سایر سرطان‌ها افزایش بیشتری داشته است (۱). با وجود پیشرفت‌های اخیر در درمان سرطان، مدت بقای بیماران مبتلا به ملانوما بهبود چندانی نداشته است که این امر، نیاز به روش‌های جدید درمانی را نشان می‌دهد (۲). ملانوما به موازات پیشرفت به یک شبکه‌ی عروقی پیشرفته نیاز دارد تا رشد و متاستاز آن را تأمین نماید (۳). رگ‌زایی ملانوما با پیش‌آگهی ضعیف، مدت بقا و افزایش سرعت عود بیماری مرتبط می‌باشد (۴).

واسکولوژنز فرایند تشکیل عروق جدید از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال می‌باشد (۵). سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، سلول‌های خونی نابالغ با قابلیت تمایز به سلول‌های اندوتلیال هستند که نقش مهمی در رشد، متاستاز و رگ‌زایی تومور ایفا می‌کنند (۶). تعدادی از سیتوکین‌ها و عوامل رشد، باعث می‌شوند که سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، از مغز استخوان به سمت گردش خون محیطی حرکت کنند و در نهایت، باعث تسهیل تشکیل عروق خونی جدید می‌شوند (۶).

سطح سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال موجود در خون محیطی در بدخیمی‌ها افزایش می‌یابد (۷). به علاوه، ثابت شده است که رگ‌زایی تومور وابسته به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در گردش می‌باشد و ایجاد اختلال در عملکرد این سلول‌ها، منجر به مهار رشد و رگ‌زایی تومور شده است (۹-۸). به دلیل اهمیت سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در روند رشد و رگ‌زایی تومور، این سلول‌ها به عنوان هدف درمانی جدید معرفی شده‌اند (۸). در سال‌های اخیر، نقش مهم و برجسته‌ی فراورده‌های طبیعی در پیشگیری از پیشرفت تومور مشخص شده است (۱۰).

انار با نام علمی Punica granatum، متعلق به خانواده‌ی Punicaceae، منبعی غنی از ترکیبات فنولی، آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها می‌باشد. تأثیرات مفید انار در تعدادی از بیماری‌ها شامل دیابت، چاقی، التهاب و آترواسکلروز مشخص شده است (۱۲-۱۱). تأثیر درمانی آب انار در سرطان‌های گوناگون از جمله سرطان پروستات، سینه، ریه و کولون گزارش شده است (۱۶-۱۳). به علاوه، شواهد نشان می‌دهد که انار، از طریق عوامل مؤثر بر آنژیوژنز باعث مهار سرطان می‌شود (۱۴-۱۲).

گیرنده‌های PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) عوامل نسخه‌برداری فعال شده توسط لیگاند هستند و عضو خانواده‌ی گیرنده‌های هسته‌ای هورمونی می‌باشند و شامل سه ایزوفرم α، β و γ هستند (۱۷). گیرنده‌های PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha) و PPAR- γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) در سلول‌های سرطانی ملانوما در مقایسه با ملانوسیت‌های عادی بیش از حد بیان می‌شوند و آگونیست‌های PPAR- α و همچنین PPAR- γ، باعث مهار رشد رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی می‌گردند (۲۱-۱۸). بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار بر روی تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال و همچنین مکانیسم اثر آن از طریق گیرنده‌های PPAR- α و PPAR- γ انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه، عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار همراه با اسید استیک جهت استخراج مؤثر آنتوسیانین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. 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 گرم پودر پوست خشک انار با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک مخلوط شد و عمل به هم زدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 درجه‌ی سانتی‌گراد 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 فریز درای منتقل گردید. پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳-۲۲).

برای انجام این مطالعه، تعداد ۸۸ موش C۵۷LB۶ نر با سن ۸-۶ هفته و وزن ۲۵ گرم به طور تصادفی به ۱۱ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. به همه‌ی موش‌ها در روز صفر مطالعه ۱×۱۰^{۶} سلول ملانومای B۱۶F۱۰ 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 میلی‌لیتر آب مقطر از طریق گاواژ (حلال عصاره) دریافت نمود. گروه دوم تا پنجم به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را از طریق گاواژ دریافت نمودند. گروه ششم دوز ۴۰۰ را به همراه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم GW۶۴۷۱ (آنتاگونیست PPAR- α) حل شده در DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به صورت داخل صفاقی دریافت نمود و گروه هفتم، دوز ۴۰۰ را به همراه T۰۰۷۰۹۰۷ ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (آنتاگونیست PPAR-γ) حل شده در DMEM به صورت داخل صفاقی دریافت نمود (۲۵-۲۴).

علت استفاده از دوزهای متعدد عصاره، بررسی رابطه‌ی دوز- پاسخ بود. گروه هشتم و نهم نیز فنوفیبرات (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روزیگلیتازون (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به ترتیب به عنوان آگونیست‌های PPAR-α و PPAR-γ از طریق گاواژ دریافت نمودند. گروه دهم و یازدهم نیز به ترتیب GW۶۴۷۱ و T۰۰۷۰۹۰۷ را به تنهایی دریافت نمودند. موش‌ها هر روز از جهت وجود توده‌ی قابل لمس در محل تزریق، بررسی شدند. در روز ۱۶ مطالعه، موش‌ها کشته شدند و ۱ میلی‌لیتر خون از قلب آن‌ها برای شمارش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال گرفته شد.

تکنیک فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (BDFACSCalibur، e۹۷۶۰۰۲۹۵) انجام گردید. پس از تجزیه‌ی گلبول‌های قرمز و دو

بار شستشو با PBS-EDTA (Phosphate buffered saline-Ethylenediaminetetraacetic acid) با اضافه کردن سرم خرگوش ۳ درصد و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جایگاه‌های واکنش غیر اختصاصی بلوک شد. پس از شستشوی مجدد با PBS، تعداد مناسب سلول‌ها پس از شمارش با لام نئوبار در دو تیوب A و B ریخته شد. به تیوب‌های A از هر نمونه در محیط تاریک و روی یخ ۱۰ میکرولیتر از هر یک از آنتی‌بادی‌های CD۳۴ کنژوگه با رنگ FITC (Fluorescein isothiocyanate) و آنتی‌بادی VEGFR۲ کنژوگه با رنگ PE (Phycoerythrin) اضافه شد و پس از یک ساعت انکوباسیون، در یخچال با پارافرمالدهید ۱ درصد فیکس شد و سپس مورد مطالعه‌ی فلوستیومتری قرار گرفت. به تیوب‌های B از هر نمونه‌ی آنتی‌بادیهای ایزوتایپ شاهد- متناظر با آنتی‌بادی‌های مصرفی اضافه شد. نتایج شمارش سلول‌های $VEGFR۲^{+}$ و $CD۳۴^{+}$ با فلوسایتومتر خوانده شد (۲۶).

در پایان، نتایج اندازه‌گیری متغیرها با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) 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. مقادیر $P < ۰/۰۵۰$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

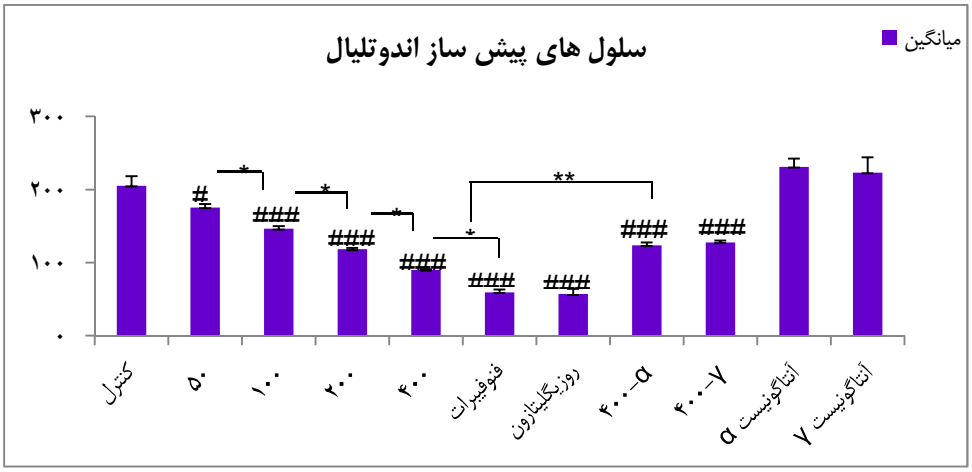
یافته‌ها

تکنیک فلوسیتومتری

تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در گروه شاهد بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵۰$) و با افزایش دوز از ۵۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۵۰$). تعداد سلول‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره به همراه آنتاگونیست‌ها، بیشتر از گروه دریافت کننده‌ی عصاره به تنهایی بود ($P < ۰/۰۵۰$). تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، در گروه‌های دریافت کننده‌ی فنوفیبرات و روزیگلیتازون، کمتر از گروه دریافت کننده‌ی بالاترین دوز انار بود ($P < ۰/۰۵۰$). آنتاگونیست‌های PPAR نیز تأثیری بر تعداد سلول‌ها نداشتند (شکل‌های ۱ و ۲).

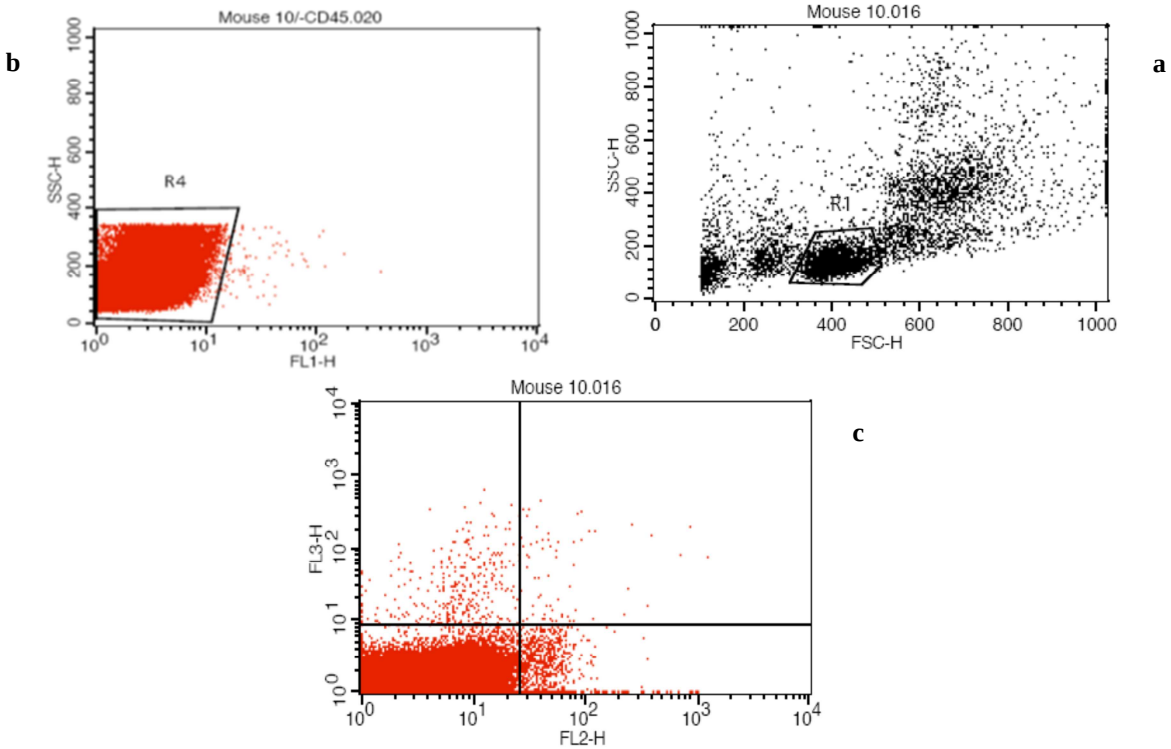
بحث

در این مطالعه برای اولین بار، اثر عصاره‌ی پوست انار بر روی تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در سرطان ملانوما به همراه مکانیسم اثر آن بررسی شد. عصاره، در همه‌ی دوزهای استفاده شده، به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال شد و با افزایش دوز، تعداد سلول‌ها کاهش بیشتری یافت. اما تعداد آن‌ها 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 تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال شد، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی پوست انار، از طریق فعال نمودن این دو گیرنده عمل می‌نماید. بنابراین، فنوفیبرات و روزیگلیتازون به عنوان آگونیست‌های PPAR-γ و PPAR-α، بیشترین اثر را در کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال داشتند.



شکل ۱. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال 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 ### مشخص شده است؛ 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 * مشخص شده است.**



شکل ۲. نمودار Dot plot مربوط به شناسایی و شمارش سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به روش فلوسایتومتری

(a) جمعیت لنفوسیتی و مونوسیتی در Dot plot مربوط به FSC و SSC گیت شد (جایی که به طور معمول EPC یا Endothelial progenitor cells یافت می‌شوند)؛ (b) برای شناسایی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال KDR^+، CD۴۵ و $CD۳۴^+$ جمعیت $CD۳۴^+$ با استفاده از نمودار SSC/FL۱ گیت گردید؛ (c) گیت CD۴۵ روی نمودار FL۲/FL۳ اعمال شد؛ در این حالت، ناحیه‌ی Double positive نمایانگر EPCها می‌باشد.

القای آنژیوژنز با افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال بالغ، از طریق تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال صورت می‌گیرد (۲۷). همچنین، سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، ترشح عوامل آنژیوژنیک از قبیل عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF یا Vascular endothelial growth factor)، عامل رشد هپاتوسیت (HGF یا Hepatocyte growth factor)، عامل تحریک کننده‌ی تشکیل کلونی گرانولوسیت (G-CSF یا Granulocyte-colony stimulating factor) و عامل تحریک کننده‌ی تشکیل کلونی گرانولوسیت–ماکروفاژ (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor یا GM-CSF) را افزایش می‌دهند.

همچنین، نشانگرهای اختصاصی سلول‌های اندوتلیال شامل گیرنده‌ی عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor receptor۲ یا VEGFR۲)، CD۳۱، CD۱۳۳، پروتئین کادهرین و عامل ون ویلبراند بر روی سطح سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال بیان می‌شود و به همین دلیل، در چسبندگی، نفوذ پذیری عروق و تنظیم پاسخ‌های سلولی در طی فرایند آنژیوژنز نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲۸–۲۷).

سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، در بهبود شرایط پاتولوژیک مانند ایسکمی با تحریک آنژیوژنز دخیل می‌باشند. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در فرایند آنژیوژنز و رشد تومور نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲۹).

بر اساس بررسی‌های انجام شده، هیچ مطالعه‌ای به طور اختصاصی به اثر انار بر روی تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال در سرطان نپرداخته بود. اما برخی از مطالعات، به اثر مهار کننده‌ی آنژیوژنز انار اشاره نموده بودند. در یک مطالعه، اثر مهار کننده‌ی آنژیوژنز پلی‌فنول‌های موجود در پوست انار، آب تخمیر شده‌ی انار و روغن دانه‌ی انار مورد بررسی قرار گرفت. این عصاره‌ها منجر به کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیال در محیط In vitro، کاهش بیان عامل محرک رشد عروقی در سلول‌های سرطان سینه و سلول‌های اندوتلیال، مهار تشکیل تیوب توسط سلول‌های اندوتلیال و مهار آنژیوژنز، در پرده‌ی کوریوآلانتوئیک جوجه شدند (۱۴).

در مطالعه‌ای دیگر، عصاره‌ی غنی از پلی‌فنول حاصل از پوست و میوه‌ی انار، منجر به کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان در محیط In vitro و در مدل حیوانی سرطان پروستات، منجر به کاهش رشد و آنژیوژنز تومور و کاهش بیان عامل محرک رشد عروقی شد (۱۳).

در مطالعه‌ای دیگر، عصاره‌ی پوست انار سیاه یزد، منجر به کاهش آنژیوژنز در مدل استاندارد In vitro شد (۳۰). به علاوه، انار حاوی مقادیر فراوانی از فلاونوئیدهای استروژنی مانند لوتئولین است که دارای خاصیت ضد آنژیوژنز می‌باشد و همچنین، عوامل القا کننده‌ی آنژیوژنز را مهار می‌کند (۳۲–۳۱). بنابراین، از آن جا که انار در سرطان موجب مهار آنژیوژنز می‌شود، کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال توسط عصاره‌ی پوست انار در این مطالعه، منطبق بر نتایج مطالعات پیشین و نیز تکمیل کننده‌ی آن‌ها می‌باشد.

در این مطالعه، اثبات شد که عصاره‌ی پوست انار، از طریق فعال نمودن گیرنده‌های PPAR-α و PPAR-γ، منجر به کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال می‌شود. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که

آگونیست‌های PPAR- α باعث مهار رشد چندین رده‌ی سلول سرطانی هم در محیط In vitro و هم در محیط In vivo شده‌اند و اثر مهار کننده‌ی رگ‌زایی این آگونیست‌ها، به فعال نمودن اختصاصی این گیرنده نسبت داده شده است (۱۹-۱۸). آگونیست‌های PPAR-γ هم با تأثیر بر مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، رگ‌زایی را مهار می‌کنند. بنابراین، مسیر PPAR-γ نیز یک هدف درمانی مهم در ملانوما به شمار می‌رود (۲۱).

نتیجه‌گیری

عصاره‌ی پوست انار در کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال مؤثر است و بخشی از این اثر، از طریق فعال نمودن مسیر PPAR صورت می‌گیرد. با این وجود، لازم است نتایج این مطالعه توسط مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیک مورد تأیید قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از طرح پژوهشی مصوب مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی به شماره‌ی ۲۹۳۴۰۲ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بابت تأمین هزینه‌ی اجرای این طرح، قدردانی می‌گردد.

References

1. Abe R, Fujita Y, Yamagishi S. Angiogenesis and metastasis inhibitors for the treatment of malignant melanoma. Mini Rev Med Chem 2007; 7(6): 649-61.
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. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. Semin Oncol 2007; 34(6): 555-65.
4. 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.
5. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol 2007; 170(1): 1-15.
6. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res 1999; 85(3): 221-8.
7. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. Neoplasia 2006; 8(2): 79-88.
8. Mellick AS, Plummer PN, Nolan DJ, Gao D, Bambino K, Hahn M, et al. Using the transcription factor inhibitor of DNA binding 1 to selectively target endothelial progenitor cells offers novel strategies to inhibit tumor angiogenesis and growth. Cancer Res 2010; 70(18): 7273-82.
9. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat Med 2001; 7(11): 1194-201.
10. Pfisterer PH, Wolber G, Efferth T, Rollinger JM, Stuppner H. Natural products in structure-assisted design of molecular cancer therapeutics. Curr Pharm Des 2010; 16(15): 1718-41.
11. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Altern Med Rev 2008; 13(2): 128-44.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. Carcinogenesis 2007; 28(1): 163-73.
16. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. J Agric Food Chem 2006; 54(3): 980-5.
17. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med 2002; 53: 409-35.
18. 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 U S A 2008; 105(3): 985-90.
19. Yasui Y, Kim M, Tanaka T. PPAR Ligands for Cancer Chemoprevention. PPAR Res 2008; 2008: 548919.
20. Eastham LL, Mills CN, Niles RM. PPARalpha/gamma expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells. Pharm Res 2008; 25(6): 1327-33.
21. Freudlsperger C, Schumacher U, Reinert S, Hoffmann J. The Critical Role of PPARgamma in Human Malignant Melanoma. PPAR Res 2008; 2008: 503797.
22. 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. Afr J Biotechnol 2012; 11(14): 3379-87.
23. 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
24. 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.
25. 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.
26. Javanmard Sh, Gheisari Y, Soleimani M, Nematbakhsh M, Monajemi A. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic rabbits. Int J Cardiol 2010; 143(2): 213-6.
27. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. Circulation 2003; 107(8): 1164-9.
28. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275(5302): 964-7.
29. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(7): 3422-7.
30. Dana N, Haghjooy Javanmard Sh, Fazilati M, Pilehvarian A. 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].
31. 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.
32. Le ML. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. Biomed Pharmacother 2002; 56(6): 296-301.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 26.02.2015
Vol. 33, No. 334, 2nd Week, July 2015
Accepted: 08.06.2015

The Inhibitory Effect of Hydroalcoholic Extract of Black Punica Granatum Pericarp on the Number of Endothelial Progenitor Cells (EPCs) in Melanoma through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α and γ (PPAR-α and γ) Pathways in C57BL6 Mice

Sima Seifabadi PharmD[1], Laleh Rafiee MSc[2], Hajar Naji-Esfahani MSc[2], Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Endothelial progenitor cells (EPCs) play an important role in tumor growth and angiogenesis. Punica granatum, from Punicaceae family, has demonstrated anticancer effects in different types of cancers. This study aimed to determine the effect of hydroalcoholic extract of pomegranate peel on the number of EPCs in mouse model of melanoma and also to determine its mechanism of action.

Methods: The hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp was prepared using 70% ethanol containing 1% acetic acid. 1×10^6 B16F10 melanoma cells were injected to each of 88 C57BL6 male mice weighing 25 g on the day 0, subcutaneously (s.c). On 7th day, mice were randomly divided into 11 groups of 8 animals. The first group (control) received distilled water. Groups second to fifth from the seventh day of the study received 50, 100, 200 and 400 mg/kg of standardized polyphenon E (PPE) via gavage. The sixth group received PPE and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) antagonist (5 mg/kg/day) intraperitoneally. The seventh group received PPE and PPAR-α antagonist (10 mg/kg/day) intraperitoneally. Eighth and ninth groups received fenofibrate (100 mg/kg) and rosiglitazone (100 mg/kg) as agonists of PPAR-α and PPAR-γ, respectively, via gavage. Tenth and eleventh groups received PPAR antagonists, merely. On 16th day, mice were euthanized and were bled through heart puncture for EPC enumeration via flow cytometry. In flow cytometry, $CD34^+/VEGFR2^+$ cells were enumerated.

Findings: PPE dose-dependently decreased the number of EPCs ($P < 0.05$). Number of EPCs in the groups which received fenofibrate and rosiglitazone was less than the group that received the highest dose of PPE ($P < 0.05$). Moreover, EPCs in the groups which received both PPAR antagonists and PPE, was more than the group which received PPE ($P < 0.01$).

Conclusion: In conclusion, we demonstrated that PPE is effective in reducing the number of EPCs and part of this effect is through modulation of PPAR pathway.

Keywords: Melanoma, Pomegranate pericarp extract, Endothelial progenitor cell, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

Citation: Seifabadi S, Rafiee L, Naji-Esfahani H, Haghjooy-Javanmard Sh. **The Inhibitory Effect of Hydroalcoholic Extract of Black Punica Granatum Pericarp on the Number of Endothelial Progenitor Cells (EPCs) in Melanoma through PPARα and PPARγ Pathways in C57BL6 Mice.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(334): 685-93

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