مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان

نسیم دانا[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]، لاله رفیعی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نقص در آپوپتوزیس (Apoptosis) نقش مهمی در تشکیل تومورها بازی می‌کند و به هم خوردن تنظیم آن، باعث مقاومت به درمان می‌شود. تأثیرات انار در مهار آپوپتوزیس و تکثیر سلولی برخی از سرطان‌ها به اثبات رسیده است. در این مطالعه، به بررسی تأثیر عصاره‌ی پوست انار سیاه بر بقای سلولی، مورفولوژی و آپوپتوزیس سلول‌های ملانوما و اندوتلیال پرداخته شد.

روش‌ها: عصاره‌ی هیدروالکلی انار پوست سیاه تهیه شد. آزمون سنجش سمیت MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) با دوزهای (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره و گروه شاهد با دی‌متیل سولفوکساید ۰/۱ درصد، بر روی رده‌های ملانوما و اندوتلیال انجام شد. آپوپتوزیس با استفاده از کیت Annexin-V و دستگاه فلوسیتومتر و مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ بررسی گردید.

یافته‌ها: عصاره‌ی انار در مدت زمان ۴۸ ساعت به طور وابسته به دوز، موجب کاهش معنی‌دار درصد بقای سلول‌های ملانوما شد ($P < ۰/۰۵$)، اما بر سلول‌های اندوتلیال اثر سمی نداشت. تیمار با دوز (۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) IC50 (Half maximal inhibitory concentration) منجر به القای آپوپتوزیس اولیه (۴۳/۰۵ درصد) و ثانویه‌ی (۰/۰۵ درصد) ملانوما گردیدکه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < ۰/۰۵$) و ۵۶/۹ درصد سلول‌های زنده سالم بودند. القای آپوپتوزیس در سلول‌های اندوتلیال مشاهده نشد؛ تنها سلول‌های ملانوما پس از تیمار، دچار تغییرات مورفولوژیک از جمله چروکیدگی و گرد شدن غشا شدند.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث القای آپوپتوزیس، مرگ و تغییر مورفولوژی سلول‌های ملانوما می‌شود، اما بر روی سلول‌های اندوتلیال اثر ندارد. به نظر می‌رسد که این عصاره، می‌تواند با آزمایش‌های بیشتر به عنوان گزینه‌ی مناسبی برای القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما به عنوان درمان کمکی استفاده شود.

واژگان کلیدی: ملانوما، عصاره‌ی پوست انار سیاه، آپوپتوزیس

ارجاع: دانا نسیم، حق‌جوی جوانمرد شقایق، رفیعی لاله. **بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۶۸-۲۴۶۱

مقدمه

درمان سرطان با شیمی درمانی و پرتودرمانی، همواره با بروز عوارض جانبی همراه بوده است؛ چرا که در این روش‌های درمانی، علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌های طبیعی هم هدف قرار می‌گیرند. در واقع، این روش‌های درمانی، به نسبت غیر انتخابی عمل می‌کنند و برخی از سرطان‌ها به این درمان‌ها مقاوم هستند (۱).

مرگ سلولی، نقشی مهم و اساسی در کنترل فیزیولوژی طبیعی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می‌کند (۳-۲). اگر چه اغلب برای سهولت، مرگ سلولی را به دو دسته‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) و مرگ تصادفی (نکروز)، تقسیم می‌کنند، اما مطابق یک طبقه‌بندی، حدود ۱۱ نوع مرگ سلولی وجود دارد که برخی ازآن‌ها عبارت از آپوپتوزیس، نکروز، اتوفاژی، انکوزیس پیروپتوزیس و ... می‌باشند(۳).

آپوپتوزیس (Apoptosis) مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوزیس خود، در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های واکنش‌گر نقش دارد (۴). هر گونه اختلال در روند آپوپتوزیس، منجر به بیماری

۱- دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

می شود که می تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشدکه منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌گردد (۵).

نقص در آپوپتوزیس، نقش مهمی در تشکیل تومورها و ایجاد نئوپلازی بازی می کند و به هم خوردن تنظیم آن، باعث مقاومت به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌گردد. این روند، ممکن است باعث افزایش متاستاز نیز بشود (۶). به طور کلی، تدابیر آپوپتوتیک برای کشتن سلول‌های توموری، شامل القای مستقیم مولکول‌های پروآپوتوتیک و تعدیل پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک یا بازسازی عملکرد ژن‌های مهار کننده‌ی رشد تومورها است (۷).

ملانومای بدخیم، یک سرطان پوست به شدت قابل گسترش به سایر اندام‌ها (Metastatic) است که به صورتی قابل توجه به درمان‌های متداول با Dacarbazine یا تموزولامایید و هچنین، پرتودرمانی مقاوم است. در واقع، در بهترین شرایط تنها ۳۰-۱۵ درصد پاسخ به درمان مشاهده می‌شود (۸). مسیرهای انتقال پیام مختلفی شناسایی شده‌اند که یا به طور ذاتی و یا تحت تأثیر جهش در تومورهای ملانوما فعال می‌شوند و تومورهای ملانوما، با استفاده از آن‌ها به بقا، تکثیر و مقاومت به آپوپتوزیس و در نهایت متاستاز دست می‌یابند (۱۰-۹).

خواص متنوع بیولوژیک گیاهان دارویی، سال ها توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله این که به تازگی، مطالعات بسیاری بر روی خاصیت ضد سرطانی بخش‌های مختلف گیاهان انجام شده است. از جمله گیاهان مؤثر بر روند آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی، می‌توان به گیاه انار اشاره کرد.

در مطالعات متعددی مشخص شده است که انار، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی است (۱۱). درخت انار، درخت کوچکی از خانواده‌ی Punicaceae است (۱۲). پوست انار محتوی مواد پلی‌فنول مانند الاجیک اسید، الاجی تانن‌ها و گالیک اسید و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. مطالعات انجام شده، نشان داده است که بسیاری از ترکیبات تشکیل دهنده‌ی پوست انار مانند کوئرسیتین، لوتئولین و کامپفرول در برابر دامنه ی وسیعی از پرواکسیدان‌ها در سیستم‌های لیپیدی، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۵-۱۳).

انار پوست سیاه، یکی از انواع انار است که در ایران پرورش داده می‌شود، اما نسبت به سایر گونه‌ها کمیاب است (۱۶). این گونه از انار، به ویژه پوست آن در طب سنتی در درمان چندین بیماری کاربرد دارد. مطالعات نشان می‌دهند که پوست این نوع انار، فلاونوئیدهای بیشتری نسبت به سایر انواع انار دارد (۱۷). مطالعات قبل، نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، دارای خواص ضد آنژیوژنز و ضد سرطانی است (۱۹-۱۸). در چندین مطالعه، خواص ضد سرطانی ترکیبات مختلف انار همچون روغن هسته و آب میوه‌ی آن، بر سرطان‌هایی نظیر پروستات، پستان، کولون و ریه، از طریق القای آپوپتوزیس نشان داده شده است (۲۲-۲۰).

با توجه به نتایج مطالعات قبلی و اثرات بخش‌های مختلف انار بر روی رده‌های سلولی سرطانی، در صورتی که بتوان راه‌کاری یافت تا با مداخله در آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی، مرگ آن‌ها را دستکاری نمود، شاید مسیر جدیدی در درمان سرطان فراهم آید. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار سیاه بر میزان بقا و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما و مقایسه‌ی آن با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان بود.

روش‌ها

تهیه‌ی عصاره: انار شیرین پوست سیاه ساوه از کلکسیون باغ انار مرکز تحقیقات کشاورزی منطقه ی دستگرد اصفهان تهیه و نام علمی آن توسط همین مؤسسه تأیید شد. پودر پوست خشک انار با حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک، مخلوط و عصاره‌گیری انجام شد (۲۳).

در ادامه، عصاره به طور جداگانه درون ویال های متعدد ریخته شد و این ویال‌ها جهت تبخیر اتانول استفاده شده در فرایند عصاره‌گیری، به دستگاه Ependorf concentrator تحت خلأ و دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول: رده‌ی سلولی سرطانی ملانومای پوستی B16F10 و سلول‌های اندوتلیال وریدی بند ناف انسان (HUVECs یا Human umbilical vein endothelial cells) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها، در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد Carbon dioxide (CO_2) انکوبه شدند. شمارش سلولی با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون‌ها، ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان‌بلو تعیین گردید که همواره بیش از ۹۵ درصد بود.

بررسی سمیت سلولی: به منظور سنجش اثر سمیت سلولی از آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد.

معرف MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، جذب میتوکندری سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیک می‌شود و بلور فورمازان بنفش رنگ تولید

می‌کند که در حلال مناسب (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) حل می‌گردد و میزان رنگ تولید شده، با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۴).

برای انجام این آزمون، ابتدا سلول‌های ملانوما و اندوتلیال هر کدام به صورت جداگانه به تعداد $10^4 \times 1$ در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در محیط کشت کامل کشت و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها برای مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های متفاوت از عصاره‌ی پوست انار (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در محیط کشت سلولی تیمارشدند. سلول‌های تیمار شده با محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد DMSO نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

برای ارزیابی میزان سمیت، ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT طبق شیوه‌نامه (شرکت ایده زیست ایران) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه پیدا کرد. سپس، مایع رویی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتاژ، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA reader (Enzyme-linked immunosorbent assay reader) (Elisa reader Biotek elx800) خوانده شد.

سنجش آپوپتوزیس: یکی از روش‌های موجود برای بررسی آپوپتوزیس، آنالیز و مطالعه‌ی مولکول‌های فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا به هنگام فرایند آپوپتوزیس است. مولکول Annexin V یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدها در حضور یون کلسیم می‌باشد. این ماده، دارای تمایل بالایی برای مولکول فسفاتیدیل سرین است. بنا بر این، برای تشخیص سلول‌های در حال آپوپتوزیس در یک جمعیت سلولی بسیار مناسب است.

در این مطالعه، میزان آپوپتوزیس سلول‌های B16F10 و HUVEC با رنگ‌آمیزی با استفاده از کیت Annexin V-FITC (Ebioscience) و دستگاه فلوسایتومتر اندازه‌گیری شد. به این صورت که سلول‌ها به تعداد $10^5 \times 1$ در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه در محیط کشت کامل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار با دوز کشنده‌ی ۵۰ درصد سلول‌ها (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) که در مرحله‌ی قبل محاسبه شده بود، قرار گرفتند.

در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها با استفاده از بافر نمکی فسفات سرد بر روی یخ از پلیت، جدا و سانتریفوژ شدند. سپس، سلول‌ها با بافر رنگ‌آمیزی شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، با ۵ میکرولیتر Annexin v-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Propidium iodide در ۱۰۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گردیدند. آن گاه، سلول‌ها دوباره شستشو و وارد ۲۵۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی شدند. در پایان، سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (BD FACS Calibur -e97600295) مورد آنالیز قرار گرفتند.

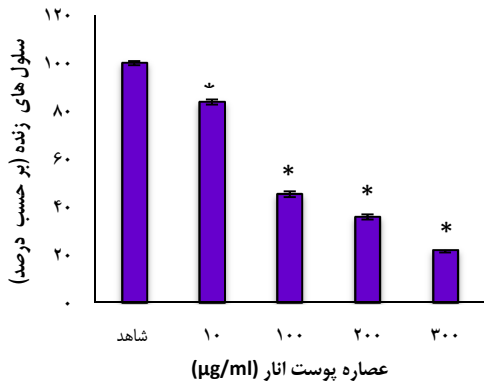
بررسی مورفولوژی: بعد از تیمار سلول‌های سرطانی B16F10 و سلول‌های HUVEC با عصاره‌ی پوست انار سیاه با غلظت ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت، تغییرات مورفولوژیکی با میکروسکوپ اینورت (Leica) با بزرگ‌نمایی ۱۰ × بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

برای بررسی نتایج به دست آمده، از آزمون‌های ANOVA و t استفاده و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی سمیت سلولی

جهت بررسی تأثیر سمیت عصاره‌ی انار پوست سیاه بر سلول‌های B16F10 و HUVEC، از آزمون MTT استفاده شد. نتایج سنجش سمیت نشان داد که عصاره‌ی پوست انار به صورت وابسته به دوزی دارای اثرات کشندگی بر رده‌ی سلولی ملانوما است؛ به طوری که اثرات کشندگی کلیه‌ی دوزهای تهیه شده از عصاره (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P < ۰/۰۵$)؛ به این صورت که در پایین‌ترین دوز موجب از بین رفتن ۱۶/۳۵ درصد سلول‌ها و در بالاترین دوز، باعث کشته شدن ۷۶/۷۴ درصد سلول‌ها شد (شکل ۱).



شکل ۱. درصد بقای سلول‌های B16F10 تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار سیاه با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد (تیمار شده با محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد دی‌متیل سولفوکساید) به مدت ۴۸ ساعت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

*: معنی‌دار بودن ارقام از لحاظ آماری نسبت به گروه شاهد ($P < ۰/۰۵$)

غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد سلول‌ها یا IC50 عصاره

(۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد. از غلظت IC50 محاسبه شده برای سایر مراحل استفاده شد. از سوی دیگر، عصاره‌ی تهیه شده، هیچ گونه اثر سمیت معنی‌داری بر روی سلول‌های اندوتلیال ندارد؛ به طوری که ۴ درصد مرگ در پایین‌ترین دوز و ۹ درصد مرگ در بالاترین دوز نسبت به گروه شاهد وجود داشت و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

سنجش آپوپتوزیس

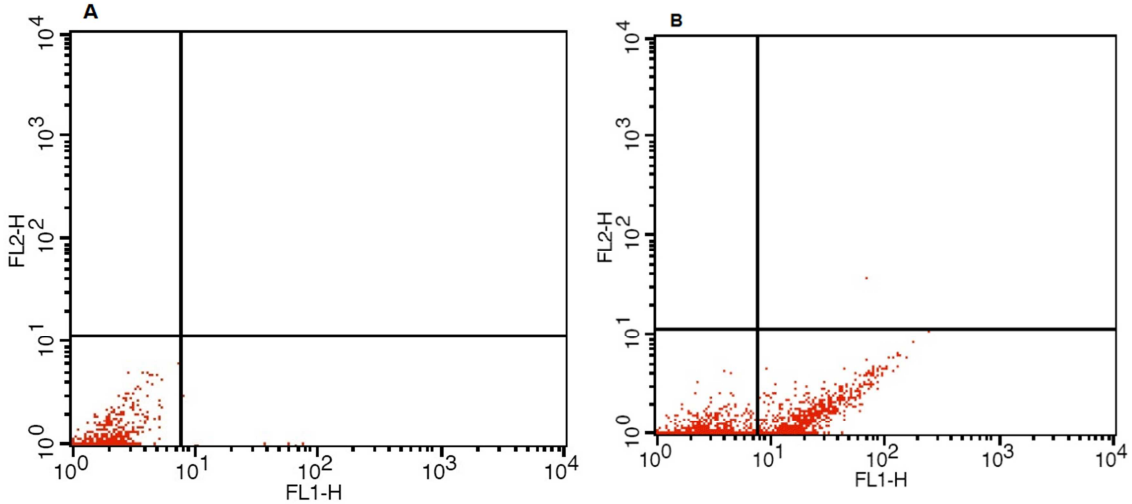
آپوپتوزیس، با رنگ‌آمیزی سلول‌ها و استفاده از کیت Annexin V-FlTC و دستگاه فلوسایتومتر تعیین شد. آپوپتوزیس اولیه با رنگ گرفتن سلول‌ها با Annexin V-FITC و رنگ گرفتن سلول‌ها با هر دو رنگ Annexin و Propidium iodide به منزله‌ی آپوپتوزیس ثانویه‌ی مثبت در نظر گرفته شد. سلول‌های فاقد تیمار (گروه شاهد)، ۹۹/۹ درصد سلول زنده‌ی سالم داشتند و تنها ۰/۱ درصد آپوپتوزیس اولیه نشان دادند (شکل ۲-A)، اما سلول‌های B16F10 تیمار شده با عصاره (۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۴۸ ساعت، ۵۶/۹ درصد سلول زنده‌ی سالم، ۴۳/۰۵ درصد آپوپتوزیس اولیه و ۰/۰۱ درصد آپوپتوزیس ثانویه داشتند (شکل ۲-B). این امر نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث القای آپوپتوزیس شده است و بیشترین میزان آپوپتوزیس، آپوپتوزیس اولیه بوده است. تیمار سلول‌های اندوتلیال با دوز IC50، هیچ گونه تأثیری در القای آپوپتوزیس این سلول‌ها نداشت و در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

تغییرات مورفولوژیکی

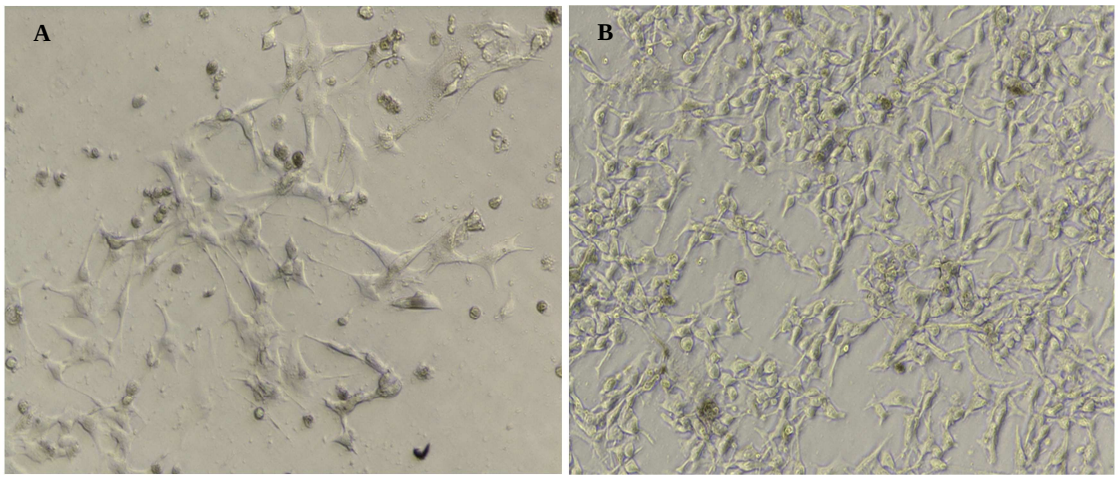
تغییرات مورفولوژی سلول‌های HUVEC و B16F10 با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی شد. تیمار سلول‌های HUVEC با عصاره، هیچ گونه تأثیری بر مورفولوژی این سلول‌ها نداشت، اما سلول‌های B16F10 پس از تیمار با عصاره با دوز ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دچار تغییراتی از جمله چروکیدگی و گرد شدن شدند (شکل ۳). آن دست از سلول‌های ملانوما که هنوز دچار آپوپتوزیس نشده‌اند، به دلیل از بین رفتن سایر سلول‌های اطرافشان شروع به کشیده شدن می‌کنند تا دوباره بتوانند اتصالات خود را با سایر سلول‌هایی که هنوز زنده‌اند، ارتباط برقرار کنند. این مشاهدات، نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث تغییرات مورفولوژی در سلول‌های ملانوما می‌شود و آثار القای آپوپتوزیس در آن‌ها دیده می‌شود.

بحث

رشد تومورهای سرطانی به دو عامل اصلی تقسیمات سلولی و مرگ سلول‌ها از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده بستگی دارد (۲۶-۲۵). مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول را می‌توان یکی از مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر سرطان دانست. بیان تنظیم نشده‌ی پروتئین‌های مهار کننده‌ی این مسیر مرگ سلولی، می تواند منجر به افزایش طول عمر سلول و در نتیجه، تجمع جهش های تغییر شکل دهنده و در نهایت، شروع و پیشرفت سرطان شود (۵). همچنین، افزایش بیان پروتئین‌های ضد مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی، منجر به رفتار تهاجمی تومور و مقاومت به درمان می‌شود (۶). در تحقیقات متعدد، رابطه‌ی معنی‌داری بین مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول و پیش‌آگهی سرطان‌هایی همچون ریه، پستان و مری نشان داده شده است (۲۷).



شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتری آپوپتوزیس سلول‌های B16F10 با استفاده از کیت Annexin V. A- سلول‌های B16F10 بدون تیمار (گروه شاهد). B- آپوپتوزیس القا شده به سلول‌های B16F10 ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه به میزان ۷۷/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر. میزان سلول زنده‌ی سالم ۵۶/۹ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۴۳/۰۵ درصد و میزان آپوپتوزیس ثانویه ۰/۰۵ درصد بوده است.



شکل ۳. مورفولوژی سلول‌های B16F10 با استفاده از میکروسکوپ اینورت Leica با بزرگ‌نمایی ۱۰ ×. A- سلول‌های تیمار نشده. B- سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار سیاه به میزان ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر

در این مطالعه، به بررسی اثر تیمار سلول‌های ملانوما (B16F10) با عصاره‌ی پوست انار سیاه بر میزان آپوپتوزیس و بقای این سلول‌ها پرداخته شد و نتایج آن با سلول‌های اندوتلیال مقایسه گردید. آنالیز بقای سلولی نشان داد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های B16F10 می‌شود. همچنین، مطالعه‌ی آنالیز آپوپتوزیس با استفاده از فلوسایتومتری نشان داد که این عصاره، به صورت معنی‌داری باعث القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما می‌گردد. نکته‌ی جالب در نتایج این تحقیق، نداشتن اثر سمیت عصاره بر سلول‌های اندوتلیال به عنوان سلول طبیعی می‌باشد.

محققین در مطالعات *In vitro* که بر روی رده‌های سلولی سرطان پروستات انجام گرفته است، نشان داده‌اند که قسمت‌های مختلف گیاه انار (آب، روغن هسته و پوست)، اثرات مهاری بر تهاجم و تکثیر سلول‌ها دارند و موجب القای آپوپتوزیس در آن‌ها می‌شوند (۲۹-۲۸). در دو مطالعه‌ی حیوانی نیز مشاهده شده است که انار، موجب مهار رشد و القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۳۰، ۲۲).

نتایج یک مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی بر روی ۴۶ مرد دریافت کننده‌ی آب انار، کاهش معنی‌داری را در سطح سرم آنتی‌ژن اختصاصی پروستات این افراد نشان داد. همچنین، نتایج این مطالعه، گویای این است که تیمار رده‌های سلولی سرطان پروستات با سرم یا پلاسمای این بیماران، موجب افزایش آپوپتوزیس و کاهش تکثیر آن‌ها می‌شود (۳۱).

از سوی دیگر، بررسی اثر ترکیبات انار بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه، نشان می‌دهد که این ترکیبات، موجب مهار آنژیوژنز، تکثیر و تهاجم این سلول‌ها می‌شود و از همه مهم‌تر، موجب القای آپوپتوزیس در آن‌ها می‌گردد (۳۴-۳۲). در مطالعات دیگری مشخص شده است که عصاره‌های مختلف انار، میزان تکثیر و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی اپیدرم حنجره (Human epithelial type 2 یا Hep2)، رده‌ی سرطانی دهانه‌ی رحم انسان HeLa ، سلول‌های A549 (سرطان ریه) و رده‌ی سلولی فیبروکارسینوما (WEHI-164) را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۷-۳۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، در طی ۴۸ ساعت، از بین رفتن سلول‌های ملانوما، تغییرات مورفولوژیک و القای آپوپتوزیس در آن‌ها، می‌تواند نشان دهنده‌ی تأثیر عصاره بر غشای پلاسمایی این سلول‌های سرطانی و مختل شدن روند حیات آن‌ها باشد. به نظر می‌رسد که این عصاره، دارای توانایی مناسبی برای استفاده بر ضد سلول‌های سرطانی است و این در حالی است که بر روی سلول‌های طبیعی اثر نمی‌گذارد. از این رو، مطالعات بیشتری نیاز است تا شاید بتوان از این عصاره به عنوان درمان کمکی همراه با درمان‌های رایج سرطان ملانوما استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۲۹۱۱۰۱ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین بودجه و امکانات لازم برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Klein S, Levitzki A. Signal transduction therapy for cancer - Whither now? Curr Signal Transduct Ther 2006; 1(1): 1-12.
2. Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. BMB Rep 2008; 41(1): 1-10.
3. Tait JF. Imaging of apoptosis. J Nucl Med 2008; 49(10): 1573-6.
4. Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. Sci Signal 2010; 3(145): re8.
5. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 87.
6. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 2000; 21(3): 485-95.
7. Adachi S, Leoni LM, Carson DA, Nakahata T. Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. Acta Haematol 2004; 111(1-2): 107-23.
8. Collins I, Workman P. Design and development of signal transduction inhibitors for cancer treatment: Experience and challenges with kinase targets. Curr Signal Transduct Ther 2006; 1(1): 13-23.
9. Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller III JR, Nosrati M, Ferreira CMM, Debs RJ, et al. NF-kB in the Vascular Progression of Melanoma. J Clin Oncol 2004; 22(4): 617-23.
10. Kashani-Sabet M, Liu Y, Fong S, Desprez PY, Liu S, Tu G, et al. Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(6): 3878-83.
11. Yoshimura M, Watanabe Y, Kasai K, Yamakoshi J, Koga T. Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69(12): 2368-73.
12. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2003; 11(11): 821-30.
13. Gu L, Weng X. Antioxidant activity and components of Salvia plebeia R.Br._ب_G_¤ a Chinese herb. Food Chemistry 2001; 73(3): 299-305.
14. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. Punica granatum L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. J Nutr 2005; 135(9): 2096-102.
15. Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. J Ethnopharmacol 2004; 92(1): 93-101.
16. Moghaddam Gh, Sharifzadeh M, Hassanzadeh Gh, Khanavi M, Hajimahmoodi M. Anti-ulcerogenic activity of the pomegranate peel (Punica granatum) methanol extract. Food Nutr Sci 2012; 4(10A): 43-8.
17. Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, et al. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. Iran J Pharm Res 2011; 10(3): 519-24.
18. Dana N, Haghjooy Javanmard Sh, Fazilati M, Pilehvarian AA. 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].
19. Dana N, Javanmard S, Rafiee L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of black pomegranate peel extract on melanoma cell line. Res Pharm Sci 2015; 10(2): 117-24.
20. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res 2014; 3: 100.
21. Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 938475.
22. Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. Cell Cycle 2006; 5(4): 371-3.
23. Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. Clin Cancer Res 2006; 12(10): 3028-36.
24. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. J Biol Chem 2001; 276(26): 24242-52.
25. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. BMC Urology 2005; 5(2).
26. Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. Curr Opin Cell Biol 1999; 11(6): 745-52.
27. Tao KY, Li XX, Xu WZ, Wang Y, Zhu SM, Xie HX, et al. Prognostic role of apoptosis-related gene functional variants in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. Onco Targets Ther 2015; 8: 147-55.
28. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Invest New Drugs 2005; 23(1): 11-20.
29. 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.
30. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(41): 14813-8.
31. Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. Clin

Cancer Res 2006; 12(13): 4018-26.
32. 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.
33. Jeune MA, Kumi-Diaka J, Brown J. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. J Med Food 2005; 8(4): 469-75.
34. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. The antioxidant potency of Punica granatum L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. J Med Food 2011; 14(12): 1638-46.
35. Sangeetha J, Vijayalakshmi K. Apoptosis induction of Punica granatum extract on human lung cancer cells. Am J PharmTech Res 2015; 5(1): 479–85.
36. Mohammed M, Saad Z. Low concentrations of pomegranate rind extract influence: proliferation, cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. Iraqi J Comm Med 2011; 1: 1-5.
37. Sineh SK, Baradaran B, Mazandarani M, Yousefi B, Abdollahpour AM, Khori V. Growth-Inhibitory and Apoptosis-Inducing Effects of Punica granatum L. var. spinosa (Apple Punice) on Fibrosarcoma Cell Lines. Adv Pharm Bull 2014; 4(Suppl 2): 583-90.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 22.10.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 14.02.2016

Comparison of the Apoptosis Induction Effect of Pomegranate Peel Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Melanoma

Nasim Dana MSc[1], Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD[2], Laleh Rafiee MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: Apoptosis defect plays an important role in the formation of tumors and its disruption causes resistance to treatment. The effects of pomegranate on the inhibition of apoptosis and cell proliferation of some cancer types have been demonstrated. The aim of this study was to investigate the effect of black pomegranate peel extract on cell survival, morphology, and apoptosis of melanoma cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods: The hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp was prepared. Toxicity of melanoma and HUVEC was evaluated through MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in the experimental group at different concentrations of the extract (10, 100, 200, 300 µg/ml) and dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1% in the control group. In addition, apoptosis was studied using Annexin-V test and flow cytometry. The morphology of the cells was examined under a microscope.

Findings: After 48 hours, melanoma cell survival significantly decreased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), but it had no effect on HUVEC proliferation. Exposure of cells to half maximal inhibitory concentration (IC50) at a dose of 77.5 µg/ml led to the induction of early apoptosis (43.05%) and late apoptosis (0.05%) in melanoma cells that was significantly increased compared to the control group ($P < 0.05$). In addition, 56.9% of cells were healthy. Apoptosis induction was not observed in HUVECs. Pomegranate peel extract only induced morphological changes such as cell shrinkage and rounding of cell membrane in melanoma cells.

Conclusion: Pomegranate peel extract induces apoptosis, death, and morphological changes in melanoma cells. However, it has no effect on HUVECs. It seems that this extract can be a good candidate for apoptosis induction in melanoma cells as complementary therapy.

Keywords: Melanoma, Pomegranate peel extract, Apoptosis

Citation: Dana N, Haghjooy-Javanmard Sh, Rafiee L. **Comparison of the Apoptosis Induction Effect of Pomegranate Peel Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Melanoma**. J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2461-8

1- PhD Student, Applied Physiology Research Center AND Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine AND Applied Physiology Research Center AND Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir