مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۱۹۵/هفته اول شهریورماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۶ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۴/۱۳

اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی پوست انار سیاه بر سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان

نسیم دانا[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]، دکتر محمد فضیلتی[۳]، دکتر علی اصغر پیله‌وریان[۴]

چکیده

مقدمه: آنژیوژنز به عنوان فرایند تشکیل عروق خونی جدید از عروق پیشین در پیشبرد پدیده‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی از جمله رشد تومور، نقش حیاتی دارد. امروزه مهار رگ‌زایی به عنوان یک عامل کمک کننده به درمان‌های مرسوم سرطان مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه سعی بر این شد تا اثرات آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی پوست انار بررسی شود.

روش‌ها: پس از تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار سیاه یزد، سلول‌های اندوتلیال جدا شده از سیاهرگ بند ناف انسان (۱×۱۰^{۵}) بر روی ماتریژل کشت داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با دوزهای متفاوت عصاره (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. سلول‌ها پس از انکوباسیون با رنگ کلسئین رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسنت از آن‌ها عکس‌برداری شد. تصاویر به دست آمده جهت بررسی طول، اندازه و تعداد انشعاب تیوب‌های تشکیل شده توسط سلول‌های اندوتلیال آنالیز شدند.

یافته‌ها: کاهش معنی‌دار وابسته به دوز طول، اندازه و تعداد انشعاب تیوب‌ها در هر سه دوز انار وجود داشت. نتایج بیشترین تأثیر معنی‌دار را با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی کاهش اندازه و طول در مقایسه با دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد. به علاوه در این دوز هیچ انشعاب تیوبی مشاهده نشد، در حالی که میزان انشعاب در دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ به ترتیب ۵۰ ± ۹۳/۶۷ و ۱۳ ± ۲۶ بود ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که عصاره‌ی پوست انار دارای اثرات آنتی‌آنژیوژنیک می‌باشد. از این‌رو می‌توان آن را به عنوان کاندیدی برای مهار آنژیوژنز در نظر گرفت تا مسیر امیدوار کننده‌ای برای درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز باز شود.

واژگان کلیدی: آنژیوژنز، انار، سلول اندوتلیال بند ناف

مقدمه

از زمان باستان تا به امروز، جهت پیش‌گیری و یا درمان بسیاری از بیماری‌ها، گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱). طی دهه‌های اخیر شناسایی فرایند رگ‌زایی و نقش حیاتی این پدیده در بروز و گسترش بیماری‌های مزمن مختلف مانند بیماری سرطان، محققان را برای یافتن ترکیبات مختلف دارای اثرات مهار رگ‌زایی، از جمله ترکیبات مشتق از منابع طبیعی، به تکاپو واداشت. علاوه بر این، با توجه به مصرف منابع طبیعی گیاهی در جوامع مختلف و به دلیل اثر ضد رگ‌زایی آن‌ها، نقش پیشگیرانه و درمانی آن‌ها در بروز این بیماری‌ها اهمیت بسیار دارد (۳-۲). در نهایت، به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان، انجام مطالعاتی با هدف شناسایی و کشف ترکیبات ضد رگ‌زایی گیاهان جهت ساخت داروها در درمان بیماری‌های وابسته به رگ‌زایی، از اهمیت شایانی برخوردار است.

آنژیوژنز یک فرایند لازم در فیزیولوژی طبیعی

[۱] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
[۴] استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

است. در حالت سلامت آنژیوژنز به کمک تعادل بین عوامل القاکننده و مهارکننده تنظیم می‌شود، در صورتی که تعادل بین این عوامل بر هم خورد، شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید (۵-۴). هنگامی که مقدار عوامل رشد آنژیوژنیک بیشتر از عوامل آنتی‌آنژیوژنیک باشد، تعادل به سمت رشد رگ‌های جدید جابه‌جا می‌شود؛ اما زمانی که مقدار مهارکننده‌ها بیشتر شود، این فرایند متوقف می‌شود (۶). استراتژی آنژیوژنز درمانی شامل مهار آنژیوژنز پاتولوژیک در مواردی مانند بیماری دیابت و تومور، یک روش درمانی جدید محسوب می‌شود (۷).

نتایج مطالعات نشان می‌دهند که مصرف رژیم غذایی گیاهی می‌تواند از گسترش و پیشرفت بیماری‌های مزمن مثل تومورهای بدخیم که گسترش و پیشرفت آن‌ها با رگ‌زایی ارتباط دارد، جلوگیری کند (۸). تاکنون گیاهان مختلفی با خواص ضد رگ‌زایی شناسایی شده‌اند و حتی ترکیبات مؤثر برخی از آن‌ها نیز جداسازی گردیده است. هم اکنون مدل‌های تحقیقاتی زیادی برای غربال گیاهانی که دارای فعالیت ضد رگ‌زایی هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹).

انار با نام علمی Punica granatum L. و نام انگلیسی Pomegranate گیاهی متعلق به خانواده‌ی Punicaceae است. متابولیت‌های موجود در قسمت‌های مختلف میوه و درخت انار شامل انواع قندها، اسیدهای آلی، آلکالوییدها، پلی‌فنول‌ها، فلاونوییدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و نظایر آن است. قندهای عمده‌ی موجود در عصاره‌ی انار شامل گلوکز، فروکتوز، ساکاروز و مالتوز (۱۰) و ویتامین‌های موجود در آن B2، B1، C و بتاکاروتن هستند (۱۲-۱۱). هم‌چنین اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید سوکسینیک، اسید تارتاریک، اسید فوماریک و اسید اگزالیک در زمره‌ی مهم‌ترین اسیدهای آلی انار هستند (۱۳، ۱۰).

الاژیک اسید، گالیک اسید، پونیکالاژین، پونیکالین، کلروژنیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، پروتوکاتچیک اسید، هیدروکسی بنزوییک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوماریک اسید، فلوریدزین، کوئرستین، کاتکین، پ-کوماریک اسید و او-کوماریک اسید انواع ترکیبات فنولی و تانی در انار هستند (۱۵-۱۴).

در این مطالعه با توجه به خواص گوناگون انار، با استفاده از مدل استاندارد آزمایشگاهی آنژیوژنز In vitro بر روی ماتریژل برای نخستین بار فعالیت ضد رگ‌زایی عصاره‌ی پوست انار سیاه مورد سنجش قرار گرفت.

روش‌ها

آماده‌سازی عصاره:

در این مطالعه انار شیرین پوست سیاه یزد 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.

www.mui.ac.ir

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 فریزدرایر منتقل گردید. پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول‌های اندوتلیال:

با توجه به ویژگی‌های سلول‌های اندوتلیال انسانی جدا شده از سیاهرگ بند ناف (HUVEC یا Human umbilical vein endothelial cells)، که بیشترین شباهت را به سلول‌های اندوتلیال عروق دارند و دارای قدرت تکثیر به نسبت خوبی هستند و به خوبی به محرک‌های خارج سلولی پاسخ می‌دهند، در این مطالعه از این رده‌ی سلولی استفاده شد.

در این مطالعه سلول‌های اندوتلیال C554 تهیه شده از انستیتو پاستور تهران در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد و O_2 ۹۵ درصد کشت داده شدند.

فرایند بررسی آنژیوژنز In vitro:

پس از آن که سلول‌ها نزدیک ۸۰ درصد سطح کشت را پوشاندند، تعداد ۱×۱۰^۵ سلول اندوتلیال در محیط کشت 200PRF Medium (Invitrogen آمریکا) به چاهک‌هایی که هر کدام با ۱۰۰ میکرولیتر از Geltrex (Invitrogen آمریکا) پوشانده شده بودند، در یک پلیت ۲۴ خانه اضافه شدند. سپس سلول‌های آماده شده تحت تیمار با سه دوز عصاره‌ی پوست انار (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. دوزهای استفاده شده در این مطالعه بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی مطالعات قبلی و به دو دلیل انتخاب شدند. اول این که دارای اثرات سمی بر روی سلول‌ها نباشند و دوم این که دارای اثرات کاهنده‌ی رشد بر رده‌های سلول‌های سرطانی باشند (۱۸-۱۶).

در این مطالعه rHu VEGF-165 (Recombinant human vascular endothelial growth factor) به مقدار ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر به عنوان شاهد مثبت و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ۱۰ درصد به عنوان شاهد منفی به کار رفتند (۱۹).

پس از اضافه نمودن عصاره، پلیت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. مرحله‌ی بررسی تشکیل تیوب توسط سلول‌ها با استفاده از رنگ Calcein (Invitrogen آمریکا) انجام گرفت. رنگ به سلول‌های اندوتلیال داخل فلاسک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه دور از نور انکوبه گردید. در پایان با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت میزان تشکیل تیوب سلول‌های اندوتلیال مشاهده شد و با بررسی اندازه، طول و تعداد انشعاب تیوب‌ها از آن‌ها به عنوان شاخص اندازه‌گیری آنژیوژنز استفاده شد (۱۹).

پس از مشاهده‌ی سلول‌ها، با استفاده از دوربین عکاسی Nikon از کلیه‌ی گروه‌ها عکس‌برداری انجام شد. سپس عکس‌ها با نرم‌افزار Angioquant آنالیز شدند (۲۰) و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های One way ANOVA و Kruskal-Wallis تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

به طور کلی نتایج ما نشان داد که با افزایش دوز

www.mui.ac.ir

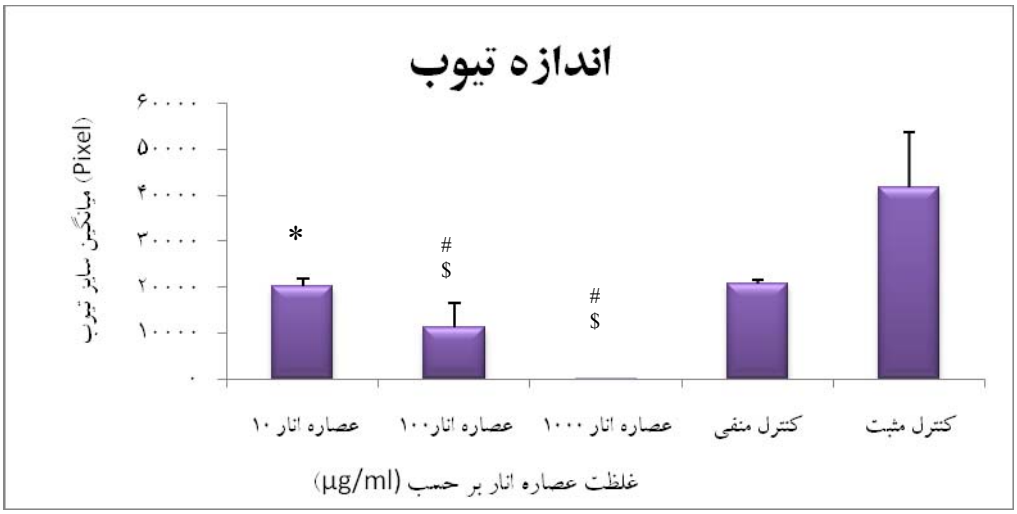
عصاره، اندازه‌ی تیوب‌های تشکیل شده کاهش یافت. عصاره‌ی استفاده شده با دوزهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌دار اندازه‌ی تیوب‌های تشکیل شده نسبت به هر دو گروه شاهد شد ($P < ۰/۰۵$)، اما عصاره‌ی با دوز ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با دو گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. در بین هر سه دوز عصاره‌ی استفاده شده، تفاوت اندازه‌ی تیوب‌ها تنها بین عصاره‌ی با دوز ۱۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۱).

نتایج نشان داد تأثیر عصاره‌ی با دوز پایین بر طول تیوب‌ها تنها با گروه شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$)، در حالی که دو عصاره‌ی دیگر با هر دو گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$). هم‌چنین بین طول تیوب‌های تشکیل شده توسط سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی با دوز ۱۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۲).

تعداد انشعاب تیوب‌های سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنها با گروه شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). هم‌چنین تعداد انشعاب تیوب‌ها در سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی با دوزهای متوسط و بالا با هر دو گروه شاهد مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳). تأثیر دوز بالا بر تعداد انشعاب تیوب‌ها به اندازه‌ای قابل توجه بود که باعث شد تعداد انشعاب سلول‌ها مساوی صفر شود (شکل ۴).

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره‌ی پوست انار موجب کاهش معنی‌دار میزان آنژیوژنز می‌شود. انار در هر سه دوز استفاده شده، موجب کاهش معنی‌دار طول، اندازه و تعداد انشعاب تیوب‌ها نسبت به گروه شاهد شد و با افزایش میزان دوز عصاره‌ای که سلول‌ها با آن تحت تیمار قرار گرفته بودند، میزان آنژیوژنز کاهش بیشتری داشت.



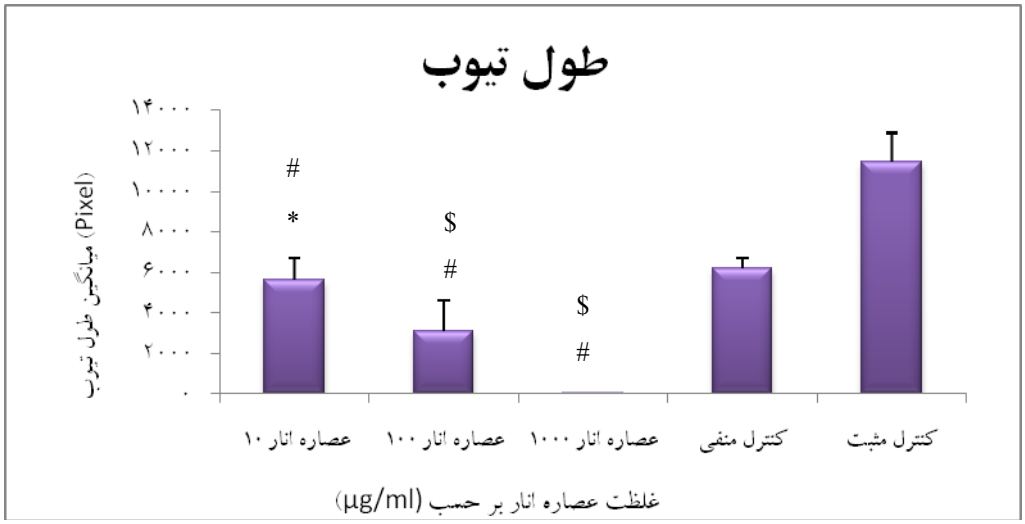
شکل ۱. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوز ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر اندازه‌ی تیوب‌ها

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

#: تفاوت معنی‌دار با شاهد مثبت ($P < ۰/۰۵$) $: تفاوت معنی‌دار با شاهد منفی ($P < ۰/۰۵$)

*: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($P < ۰/۰۵$)

www.mui.ac.ir

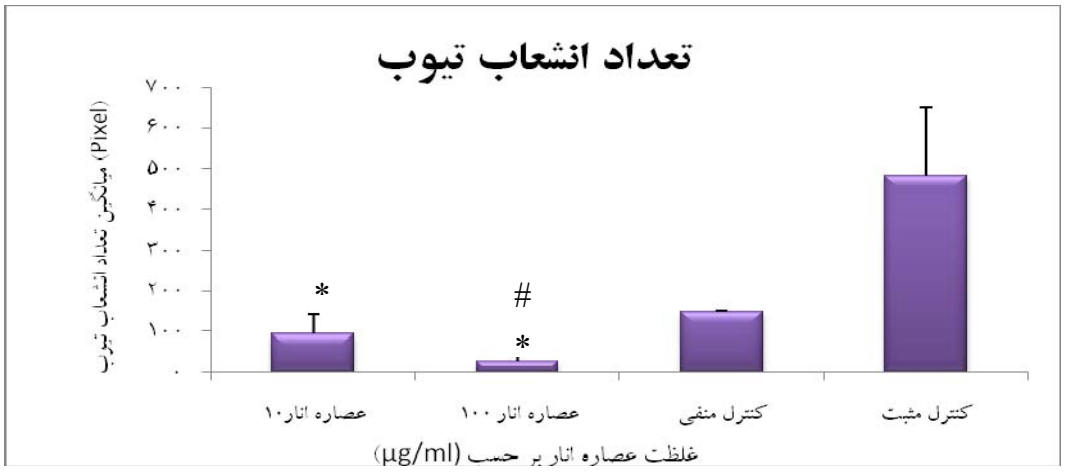


شکل ۲. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوز ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر طول (Length) تیوب‌ها

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

#: تفاوت معنی‌دار با شاهد مثبت ($P < ۰/۰۵$) $: تفاوت معنی‌دار با شاهد منفی ($P < ۰/۰۵$)

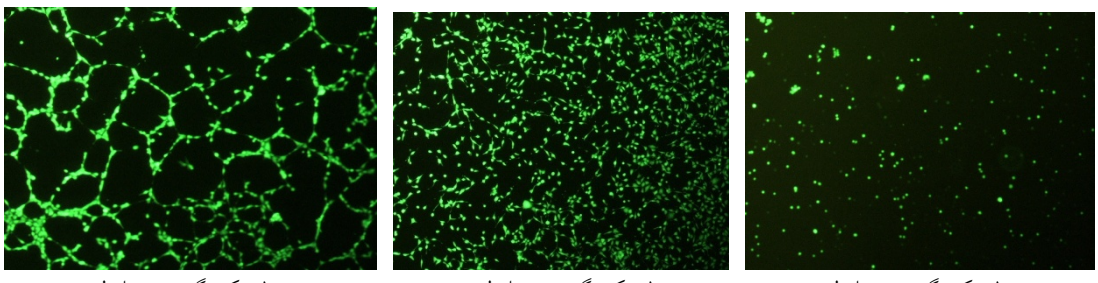
*: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($P < ۰/۰۵$)



شکل ۳. مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی پوست انار با دوز ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر تعداد انشعاب (Junction) تیوب‌ها

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

*: تفاوت معنی‌دار با شاهد مثبت ($P < ۰/۰۵$) #: تفاوت معنی‌دار با شاهد منفی ($P < ۰/۰۵$)



دوز ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دوز ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

شکل ۴. اثر مهارکنندگی عصاره‌ی پوست انار در سه دوز متفاوت بر آنژیوژنز در مدل In vitro. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت گرفته شده‌اند (بزرگنمایی ×۴). انار در هر سه دوز استفاده شده دارای اثر مهاری بود و با افزایش دوز مهار آنژیوژنز نیز افزایش یافت.

در راستای بررسی نقش انار بر آنژیوژنز و فاکتورهای دخیل در این فرایند مطالعات زیادی صورت نگرفته است. پوست و آب انار سرشار از فلاونوییدهای استروژنیک مانند لوتئولین است که خواص آنتی‌آنژیوژنیک آن‌ها در مطالعات نشان داده شده است (۲۳-۲۱).

برخی مطالعات نشان داده است که پوست و آب انار عواملی که آنژیوژنز را پیش می‌برند، مانند فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، مهار می‌کنند (۲۳). علاوه بر این، روغن دانه‌ی انار به طور عمده از سه پیوند دوگانه، اسید لینولئیک کنژوگه و پونیسیک اسید تشکیل شده است (۲۴). دو نوع شایع از اسید لینولئیک کنژوگه در گوشت گاو و شیر موجود است که آنژیوژنز را مهار می‌کنند. این زمینه‌ها می‌تواند مؤید خواص آنتی‌آنژیوژنیک انار باشد (۲۵).

پتانسیل‌های آنتی‌آنژیوژنیک انار برای اولین بار در مطالعه‌ی Toi و همکاران نشان داده شد، اما در این مطالعه روغن دانه‌ی انار و آب انار تخمیر شده مورد استفاده قرار گرفته بود (۲۶). آن‌ها نشان دادند پلی‌فنول‌های موجود در این دو بخش انار هستند که خاصیت آنتی‌آنژیوژنیک آن را اعمال می‌کنند و ترکیبات انار مهار آنژیوژنز را از طریق کاهش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در رده‌ی سلول MCF-7 سرطان پستان و سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان انجام می‌دهند (۲۶).

گزارش شده است که میوه، آب، دانه و روغن دانه‌ی انار بر سرطان‌های پروستات، پستان، پوست، روده‌ی بزرگ، ریه، دهان و خون از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیری (مهار رشد، اختلال در سیکل سلولی و آپوپتوز)، مهار آنژیوژنز و ضد التهابی اثر می‌گذارد (۲۷).

در مطالعات متعددی مشخص شده است که انار دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی است و در درمان و پیش‌گیری سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و دیابت مؤثر است (۲۸).

بخشی از خواص درمانی پوست انار به ترکیبات مفید موجود در آن از جمله فلاوونوییدها مربوط می‌شود (۳۰-۲۹).

مطالعات اخیر نشان داده است که چندین پلی‌فنول، از جمله EGGG (Epigallocatechin-3-gallate) در چای سبز و Resveratrol در شراب قرمز، موجب مهار رگ‌زایی می‌شوند. در این مطالعه یکی از فرضیه‌های استفاده از عصاره‌ی پوست انار به عنوان یک عامل آنتی‌آنژیوژنیک از همین مطلب نشأت گرفته است (۳۱). مطالعات نشان می‌دهند که محتوای فنولیک تام، فلاوینوییدها و پروتانتروسیانیدین‌ها در عصاره‌ی پوست انار بیشتر از عصاره‌ی پالپ آن است (۳۲).

تاکنون، استراتژی‌های وسیعی توسط دانشمندان جهت مداخله در آنژیوژنز تعریف و ارائه شده و مورد توجه محققان و پزشکان بسیاری قرار گرفته‌اند. در این زمینه، محققان کشورمان نیز همچون دیگر محققان در سراسر دنیا با بهره‌گیری از مدل‌های آنژیوژنز موفق به شناسایی و مطالعه‌ی انواعی از ترکیبات مهارکننده‌ی آنژیوژنز همچون شناسایی پپتید ضد آنژیوژنزی از غضروف کوسه‌ی ماهی(۳۳)، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پلاسمینوژن (۳۴)، مهارکننده‌ی تریپسین کونیتز از دانه‌ی سویا (۳۵)، مطالعه‌ی خواص و مکانیسم‌های ضد رگ‌زایی گیاه موسیر (۳۶) و گیاه مریم گلی (۳۷)، همچنین مطالعه‌ی اثر ضد آنژیوژنز چای سبز (۳۸) شده‌اند. در این مطالعه نیز سعی بر این شد تا با توجه

به خواص گیاه انار اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره‌ی پوست انار سیاه بر روی آنژیوژنز بررسی شود.

از آن جایی که آنژیوژنز وابسته به فعال شدن تکثیر، اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول اندوتلیال است، بنابراین اکثر رویکردها برای تعدیل آنژیوژنز، بر اعمال سلول‌های اندوتلیال در طی تشکیل رگ خونی متمرکز شده است (۴۰-۳۹).

از این رو با طراحی این مطالعه این فرضیه که عناصر موجود در پوست انار ممکن است قادر به مهار آنژیوژنز از طریق تأثیرگذاری بر سلول‌های اندوتلیال باشند، به تأیید رسید.

به همین جهت با در نظر گرفتن تأثیرات مثبتی که عصاره‌ی پوست انار بر مهار آنژیوژنز نشان داد، باید گام‌های بعدی در این زمینه، جهت یافتن مکانیسم عمل آن در روند مداخله در آنژیوژنز و بررسی اثرات آن در مدل‌های In vivo برداشته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۲۸۹۲۷۳ می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین هزینه‌ی این طرح سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Ichikawa H, Nakamura Y, Kashiwada Y, Aggarwal BB. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. Curr Pharm Des 2007; 13(33): 3400-16.
2. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutr Cancer 1992; 18(1): 1-29.
3. Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. Pharmacol Res 2008; 57(4): 259-65.
4. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med 2003; 3(7): 643-51.
5. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. Leukemia 2007; 21(1): 44-52.
6. Salehi E, Amjadi F, Khazaei M. Angiogenesis in Health and Disease: Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Journal of Isfahan Medical School 2011; 29(132): 312-26.
7. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997; 386(6626): 671-4.
8. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. Eur J Cancer 2001; 37(8): 948-65.
9. Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. Semin Oncol 2001; 28(6): 570-6.
10. Melgarejo P, Salazar D, Artes F. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. European Food Research and Technolog 2000; 211: 185-90.
11. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 1999; 269(2): 337-41.
12. Ozkan M, Karca A, Cemero B. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. FOOD CHEMISTRY 2004; 86: 67-75.
13. Poyrazoglu E, Gokmen V, Artik N. Organic acids and phenolic compounds in Pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey. Journal of food composition and analysis 2002; 15(5): 567-75.
14. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem 2000; 48(10): 4581-9.
15. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, et al. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. Drugs Exp Clin Res 2002; 28(2-3): 49-62.
16. Khonkarn R, Okonogi S, Ampasavate C, Anuchapreeda S. Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. Food Chem Toxicol 2010; 48(8-9): 2122-9.
17. Sreeja S, Santhosh Kumar TR, Lakshmi BS, Sreeja S. Pomegranate extract demonstrate a

selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. J Nutr Biochem 2012; 23(7): 725-32.
18. Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. Food Chemistry 2007; 103(3): 839-46.
19. Lee J, Majumder S, Chatterjee S, Muralidhar K. Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. J Biosci 2011; 36(2): 341-54.
20. Niemisto A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. IEEE Trans Med Imaging 2005; 24(4): 549-53.
21. 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.
22. Le ML. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. Biomed Pharmacother 2002; 56(6): 296-301.
23. 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.
24. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol 1999; 66(1): 11-7.
25. Masso-Welch PA, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker S, Ramirez RA, et al. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. Cancer Res 2002; 62(15): 4383-9.
26. 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.
27. Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. J Clin Oncol 2009; 27(16): 2712-25.
28. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): a review. Altern Med Rev 2008; 13(2): 128-44.
29. Toklu HZ, Sehirli O, Ozyurt H, Mayadagli AA, Eksioglu-Demiralp E, Cetinel S, et al. Punica granatum peel extract protects against ionizing radiation-induced enteritis and leukocyte apoptosis in rats. J Radiat Res 2009; 50(4): 345-53.
30. 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.
31. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett 2008; 269(2): 199-225.
32. Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry 2006; 96(2): 254-60.
33. Hassan ZM, Feyzi R, Sheikhian A, Bargahi A, Mostafaie A, Mansouri K, et al. Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis. Int Immunopharmacol 2005; 5(6): 961-70.
34. Mansouri K, Mirshahi M, Pourfathollah A, Hassan ZM, Taheripak R. Anti-plasminogen monoclonal antibody (MC2B8) inhibites angiogenesis. Pak J Biol Sci 2007; 10(19): 3450-3.
35. Shakiba Y, Mansouri K, Mostafaie A. Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. Fitoterapia 2007; 78(7-8): 587-9.
36. Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahmi R, Siami A. Antiangiogenic effect of aqueous extract of shallot (Allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model. Yakhteh Medical Journal 2009; 11(2): 190-5.
37. Keshevarz M. The study of anti-angiogenic effect of Salvia officinalis on human umbilical vein endothelial cells [Thesis]. Kermanshah, Iran: Razi University; 2009.
38. Shakiba Y, Mostafaie A. Inhibition of corneal neovascularization with a nutrient mixture containing lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract. Arch Med Res 2007; 38(7): 789-91.
39. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. J Cell Biol 1983; 97(1): 153-65.
40. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. J Cell Biol 1989; 109(1): 317-30.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 195, 1st week, September 2012 Received: 25.3.2012 Accepted: 3.7.2012

Anti-Angiogenic Effects of Pomegranate Peel Extract (*Punica Granatum L.*) on Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Nasim Dana MSc[1], Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD[2], Mohammad Fazilati PhD[3], Ali Asghar Pilehvarian PhD[4]

Abstract

Background: Angiogenesis, the process of forming new blood vessels from previously existing vessels, plays an important role in the development of various physiological and pathological phenomena including tumor growth. Currently, angiogenesis inhibition is considered as a supplement for the conventional cancer treatments like chemotherapy and radiation therapy. This study aimed to investigate the anti-angiogenesis effects of pomegranate peel extract.

Methods: Hydroalcoholic extract was prepared from the peel of black pomegranate (from Yazd, Iran). Afterwards, 1×10^5 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured on Matrigel and treated with different doses of extract (10, 100, and 1000 µg/ml) for 24 hours. The cells were then stained with calcein and investigated by fluorescent microscopy. The obtained images were analyzed by AngioQuant software. Data analysis was performed in $SPSS_{15}$ using Kruskal-Wallis and one way analysis of variance (ANOVA).

Findings: Significant dose-dependent reductions were detected in the length, size, and number of junctions of the tubes at all 3 doses of pomegranate peel extract. The most significant anti-angiogenic effect was observed as the dose 1000 µg/ml. Compared to the other 2 doses, this dose could better reduce tube size (19.46 ± 2.61 vs. 20186 ± 1627 at 10 µg/ml and 11195.67 ± 5454 at 100 µg/ml) and tube length (66 ± 12 vs. 5602 ± 1108 at 10 µg/ml and 3084.4 ± 1541 at 100 µg/ml). Furthermore, there were no junctions at 1000 µg/ml while the junction formation was 93.67 ± 50 and 26 ± 13 at 10 and 100 µg/ml, respectively.

Conclusion: Our results indicated anti-angiogenic effects of pomegranate peel extract. It can thus be considered as a candidate for the inhibition of angiogenesis in pathologic angiogenesis-dependent diseases.

Keywords: *Punica granatum*, Human umbilical vein endothelial cells, Angiogenesis

[1] Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Biochemistry, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.
[4] Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Isfahan Payam-e-Noor University, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir