Original Paper

Effect of Pomegranate peel extract on expression of angiogenesis stimulating gene (*VEGF*) in A2780 cell line of ovarian cancer

Fateme Zamani Esmati, M.Sc. in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3560-2530

***Narges Nikoonahad Lotfabadi**, **Corresponding Author**, Ph.D in Develpmental Biology, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran. **E-mail: nikounahad_1976@yahoo.com** ORCID ID: 0000-0003-2214-7268

Bibi Fatemeh Haghiralssadat, Ph.D of Nanobiotechnology, Assistant Professor, Department of Advanced Medical Sciences and Technology, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8655-2118

Abstract

Background and Objective: Ovarian cancer, also known as "The Silent Killer," is one of the most dangerous cancers for women, which often diagnosed late and incurable. On the other hand, conventional therapies currently have limitations, failures and various side effects. This study was performed to determine the effect of pomegranate peel extract on the expression of angiogenesis stimulating gene (Vascular Endothelial Growth Factor: *VEGF*) by culturing A2780 cell line of ovarian cancer.

Methods: In this descriptive-analytical study, pomegranate peel extract was prepared and then ovarian cancer cells (A2780 cell line) were exposed to different concentrations of pomegranate peel extract (500, 250, 100, 75, 50, 25 and 10 µg/ml) for 48, 24 and 72 hours. Also, the survival rate of the cells was tested by MTT assay and *VEGF* gene expression was evaluated using RT-PCR.

Results: Pomegranate peel extract concentration of 500 µg/ml reduced the survival rate to 18% in 72 hours ($P<0.05$). At concentrations of 200, 100 and 50 µg/ml of pomegranate peel extract, the expression of *VEGF* reduced by 7%, 16% and 19%, respectively, which was significant compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Pomegranate peel extract, due to its numerous compounds and significant antioxidant properties, is likely to reduce metastasis and malignant manifestations by reducing the expression of the angiogenesis agent.

Keywords: Pomegranate, Ovarian cancer, Survival rate, *VEGF*, Angiogenesis

Received 18 Sep 2019 **Revised** 21 Oct 2019 **Accepted** 12 Nov 2019

Cite this article as: Zamani Esmati F, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghiralssadat BF. [Effect of Pomegranate peel extract on expression of angiogenesis stimulating gene (*VEGF*) in A2780 cell line of ovarian cancer]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Summer; 22(2): 68-74. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر عصاره پوست انار بر بیان ژن تحریک‌کننده رگ‌زایی (*VEGF*) در سلول‌های رده A2780 از سرطان تخمدان

فاطمه زمانی عصمتی، کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران. ORCID ID: 0000-0003-3560-2530

*** دکتر نرگس نیکونهاد لطف‌آبادی**، دکتری سلولی تکوینی جانوری، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران. ORCID ID: 0000-0003-2214-7268

دکتر بی‌بی فاطمه حقیرالسادات، دکتری نانوبیوتکنولوژی، استادیار گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
ORCID ID: 0000-0002-8655-2118

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان تخمدان یکی از خطرناک‌ترین سرطان‌های زنان است. زیرا عموماً دیر تشخیص داده شده و غیرقابل درمان است. از سوی دیگر، شیوه‌های درمانی متداول در حال حاضر با محدودیت‌ها، شکست‌ها و عوارض جانبی گوناگونی همراه هستند. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره پوست انار بر بیان ژن تحریک‌کننده رگ‌زایی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEFG) با کشت سلول‌های رده A2780 از سرطان تخمدان انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی عصاره پوست انار تهیه و سپس سلول‌های سرطان تخمدان (رده A2780) در معرض غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت قرار داده شدند. سپس میزان بقای سلول‌ها با استفاده از تست MTT و میزان بیان ژن VEGF با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *عصاره پوست انار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۷۲ ساعت باعث کاهش ۱۸ درصدی میزان بقاء شد (P<۰/۰۵). در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره پوست انار میزان کاهش بیان ژن VEGF به ترتیب ۷ درصد، ۱٦ درصد و ۱۹ درصد به‌دست آمد که این کاهش بیان در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). کمترین میزان بقا در هر سه زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مربوط به دوز ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که به‌ترتیب ۳۰ درصد، ۲۵ درصد و ۱۸ درصد تعیین شد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *احتمالاً عصاره پوست انار به واسطه دارا بودن ترکیبات متعدد و خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌تواند با کاهش بیان عامل رگزایی، سبب کاهش متاستاز و تظاهرات بدخیمی شود.*

کلید واژه‌ها: *انار ، سرطان تخمدان ، میزان بقاء ، VEGF ، رگزایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر نرگس نیکونهاد لطف آبادی ، پست الکترونیکی nikounahad_1976@yahoo.com

نشانی: یزد، بلوار دانشجو، جنب اداره برق منطقه‌ای، دانشگاه علم و هنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۳۸۲۶۴۰۸۰-۰۳۵، نمابر ۳۸۲۶۴۰۹۲

وصول مقاله: ۱۳۹۸/٦/۲۷ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۷/۲۹ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۸/۲۱

مقدمه

سرطان به معنای رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیرطبیعی سلول‌های بدن است. اغلب سلول‌های طبیعی بدن در پاسخ به تحریکاتی که از داخل و خارج بدن به آنها وارد می‌شود؛ رشد و تولید مثل می‌کنند و در نهایت می‌میرند. اگر این فرآیند در مسیر متعادل و صحیح خود اتفاق بیفتد؛ بدن سالم می‌ماند و عملکرد طبیعی خود را حفظ می‌کند؛ اما مشکلات زمانی شروع می‌شود که یک سلول طبیعی دچار جهش و یا تغییر شده و به سلول سرطانی تبدیل می‌شود (۱و۲). لذا سرطان دارای تغییرات ژنتیکی است که باعث از هم گسیخته شدن نظم طبیعی تقسیم و تمایز سلول‌ها می‌شود. اختلالات ژنتیکی از طریق وراثتی و غیروراثتی موجب تحولات جدیدی در کنترل رشد سلولی می‌شوند (۱). در حدود ۹۳ درصد سرطان‌ها نتیجه تاثیرات عوامل محیطی است و فقط ۷ درصد آنها جنبه وراثتی دارند. به کمک پیشرفت‌های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و تکنیک‌های مولکولی، اطلاعات زیادی به‌دست آمده که در شناخت زود هنگام سرطان کمک خواهد کرد و همچنین غربالگری به موقع برای بعضی از سرطان‌ها کمک موثری در تشخیص زود هنگام آن می‌نماید (۲).

سرطان تخمدان کشنده‌ترین سرطان ژنیکولوژیک زنان است و ۲درصد زنانی که سابقه فامیلی ابتلا به آن را ندارند؛ ممکن است در طول عمر خود به آن مبتلا شوند. متأسفانه تاکنون نه آزمون غربالگری و نه روش پیشگیری که باروری را نیز حفظ کند؛ برای این بیماری وجود نداشته است (۱و۲). به‌طور کلی میزان ابتلا به سرطان تخمدان با افزایش سن بالاتر می‌رود و بیشتر زنانی که سابقه ابتلا به سرطان تخمدان در خانواده‌هایشان وجود داشته؛ در معرض خطر هستند (۳).

مطالعات جدید برای درمان سرطان تخمدان می‌تواند بسیار موفقیت‌آمیز باشد. معمولاً با جراحی تمام تومور یا در مرحله پیشرفته تا جایی که ممکن است آن را برمی‌دارند و به‌دنبال آن پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی انجام می‌دهند. جراحی موفقیت‌آمیزترین معالجه برای سرطان تخمدان است (۴و۵). گاهی اوقات قبل از جراحی، شیمی‌درمانی اجرا می‌شود تا تومور (توده) را کوچک کنند. در اکثر مواقع بعد از عمل جراحی از شیمی‌درمانی استفاده می‌شود تا تومور را کوچک کرده و علایم سرطان را کم کنند (۶و۷). درمان اولیه سرطان تخمدان نتایج کلینیکی خوبی را نشان می‌دهد؛ ولی بیماران پس از مدتی به درمان مقاوم می‌شوند. امروزه مقاومت به شیمی‌درمانی سدی مقاوم در برابر درمان موفق سرطان تخمدان به حساب می‌آید. بنابراین یافتن داروهای موثرتر یا مکمل درمان همراه با عوارض جانبی کمتر برای افزایش طول عمر بیماران ضروری است (۷و۸).

در دو دهه اخیر توجه محققان به داروهای گیاهی به عنوان عوامل ضدتوموری و ضدسرطانی بیشتر شده است. امروزه داروهای گیاهی به عنوان یک شیوه درمانی مکمل یا جایگزین برای معالجه سرطان نیز کاربرد دارند. هدف از تجویز این نوع داروها حفظ سلامت بدن و تنظیم عملکرد دستگاه ها واعضای مختلف آن است (۹).

انار با نام علمی *Punica granatum* درخت یا درختچه‌ای بزرگ، پرشاخ و برگ با پاجوش‌های زیاد از شاخه پیدازادان، رده نهاندانگان، دولپه‌ای و متعلق به کوچک‌ترین خانواده گیاهی یعنی *Punicacea* است (۹و۱۰). تحقیقات زیادی وجود ترکیبات پلی‌فنل یکی از جمله پونیک الاجین (punicalagin) و مشتقات الاجی تانینها (Ellagi tannins) در پوست انار را اثبات و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار را بررسی نموده‌اند. الاژیک اسید (Ellagic acid) موجود در انار از بروز سرطان جلوگیری کرده و رشد تومورهای سرطانی را کند می‌سازد. پوست انار حاوی ترکیبات ضدالتهابی، ضدتکثیری و ضدتوموری است. انار و ترکیبات آن روی مسیرهای سیگنالینگ سلول‌های سرطانی از جمله التهاب، تکثیر و مسیرهای آغاز تومورزایی و متاستاز نیز دخالت دارند (۱۰). Song و همکاران نشان دادند که پلی‌فنل‌های موجود در پوست انار می‌توانند از طریق سرکوب چرخه سلولی و القای مسیر آپوپتوز میتوکندریایی از رشد سلول‌های سرطان کبد ممانعت کنند (۱۱). البته تفاوت این مطالعه با پژوهش Song و همکاران (۱۱) در این است که در این مطالعه از کل ترکیبات موجود در عصاره استفاده شده است. پلی‌فنل‌های موجود در عصاره پوست انار آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که در صنعت و درمان استفاده می‌شوند. یکی از اثرات پلی‌فنل‌های موجود در عصاره پوست انار، تأثیر بر مسیرهای سیگنالینگ آنژیوژنز است (۱۰). یکی از عوامل درگیر در این مسیرها، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEFG) است که از طریق کمبود اکسیژن (هیپوکسی) القا شده و اعمالی از قبیل القای رگزایی، تحریک رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و مهار آپوپتوز، فعال‌سازی آنزیم‌های درگیر در تخریب ماتریکس خارج سلولی و تنظیم نفوذپذیری رگ را انجام می‌دهد (۱۲و۱۳).

این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره پوست انار بر بیان ژن تحریک‌کننده رگ‌زایی (*VEGF*) با کشت سلول‌های رده A2780 از سرطان تخمدان انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی – تحلیلی در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه علم و هنر انجام شد. مطالعه مورد تایید (IR.SSU.RSI.REC.1398.038) کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی قرار گرفت.

تهیه عصاره پوست انار: انار مورد نیاز (نام علمی *Punica granatum* با ژنوتیپ پوست سیاه ابرندآباد یزد، هرباریوم ۲۵۶۷) از یک باغ تحقیقاتی از شهرستان شاهدیه واقع در استان یزد تهیه شد. پوست قرمز رنگ آن جدا و به روش خشک کردن در سایه خشک و سپس پودر شد. با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال حاوی مخلوطی از متانول (۸۰ درصد)، آب مقطر (۱۹ درصد) و هیدروکلرید اسید ۱/۵ نرمال (۱ درصد) با نسبت ۱۵:۱، عصاره پوست انار به آرامی گرفته شد و عصاره حاصله توسط کاغذ واتمن فیلترگردید. سپس به منظور تبخیر حلال، عصاره حاصل داخل حمام آب گرم در دمای بین ۴۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از تبخیر کامل حلال، عصاره به‌دست آمده وزن شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

تست های فیتوشیمیایی: برای شناسایی برخی متابولیت‌های ثانویه، تست‌های شیمیایی از جمله تست تانن (Tannin)، استروئید (Steroid)، فنل (phenol)، فلاونوئید (flavonoid)، ترپنوئید (Terpenoid)، آلکالوئید (Alkaloid)، ساپونین (Saponin)، فلوباتانین (phlobatannins)، پروتئین، ویتامین C، گلیکوزید (glycoside) و استرول (Esterol) با استفاده از معرف‌های شیمیایی و روش‌های استاندارد ذکر شده در مقالات، روی عصاره انجام گردید (۱۴). ترکیبات شامل ترکیبات فنلی، ترکیبات فلاونوئید، ترکیبات تری ترپنوئید، ترکیبات آلکالوئید، تانن، استروئید، ساپونین‌ها، استرول، گلیکوزید، پروتئین‌ها و ویتامین C بودند.

ارزیابی سمیت سلولی القا شده توسط عصاره پوست انار: برای تعیین سمیت سلولی و میزان بقاء از آزمون MTT استفاده شد. تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول A2780 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کاشته و پس

از ۲۴ ساعت زمان‌دهی برای چسبیدن سلول‌ها به کف، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکرگرم بر میلی‌لیتر از عصاره پوست انار قرار گرفتند و تیمار شدند. پس از هر بازه زمانی، محلول MTT با غلظت ۰/۰۵ mg/ml تهیه شد و به چاهک‌ها اضافه گردید. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد DMSO به عنوان حلال به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها over night شدند. سپس جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا (مدل BioTek_ELx 800) خوانده شد. هر غلظت به صورت چهار بار تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار Excel مورد بررسی قرارگرفت و میزان غلظت IC50 با استفاده از نرم‌افزار Origin محاسبه گردید. در تست MTT میزان مرگ سلولی برابر است با:

$$\text{درصد بقاء} = \frac{\text{جذب نوری چاهک‌های تیمار شده} - \text{جذب نوری چاهک‌های بلانک}}{\text{جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی} - \text{جذب نوری چاهک‌های بلانک}} \times ۱۰۰$$

استخراج RNA : در این مرحله ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول درون هر چاهک از پلیت ۶ خانه کاشته و پس از ۲۴ ساعت زمان دهی، جهت چسبیدن سلول‌ها به کف، با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. استخراج RNA به کمک کیت استخراج ستونی شرکت دنا زیست مشهد و بر اساس روش استاندارد درج شده توسط شرکت سازنده انجام گردید.

بررسی کمیت RNA : پس از استخراج RNA برای بررسی کمی آن از دستگاه نانودراپ (Analytica Jena,Germany) استفاده شد. بررسی میزان جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ nm، غلظت RNA را نشان می‌دهد. برای تعیین میزان خلوص RNA و بررسی وجود آلودگی با DNA نسبت A260/A280 محاسبه گردید. این نسبت در نمونه خالص RNA مساوی ۲-۱/۸ است. هر چه نسبت محاسبه شده کمتر از میزان استاندارد باشد؛ نشان‌دهنده آلودگی بیشتر با پروتئین است. میزان جذب A260/A230 نیز بیانگر میزان آلودگی با فنل یا کلروفرم است. محدوده این مقدار بایستی در حدود ۲/۲-۲ قرار گیرد. به سبب این که استخراج RNA با ترایزول روشی بر پایه فنل و کلروفرم است؛ بنابراین احتمال آلودگی با این مواد نیز وجود خواهد داشت.

بررسی کیفیت RNA : برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شدند.

سنتز DNA مکمل (cDNA): ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده توسط کیت RT – PCR kit ساخت شرکت پارس توس مشهد بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

طراحی و سنتز پرایمر: پرایمرهای ژن‌های *VEGF* و GAPDH (به عنوان Housekeeping Gene) با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی و از شرکت پیشگام تهیه شدند. توالی پرایمرها مطابق جدول یک بود.

بررسی بیان ژن با استفاده از واکنش Real-Time PCR: در ابتدا به منظور اطمینان از بازده واکنش برای بررسی بیان ژن منحنی استاندارد رسم گردید. بدین جهت یک سری رقت‌های سریالی از یک نمونه cDNA برای هر دو پرایمر تهیه و واکنش توسط دستگاه انجام شد. منحنی استاندارد توسط دستگاه رسم و بازده واکنش محاسبه شد. در این بخش از Hot Taq Sybergreen qPCR master Mix(n.k) ساخت شرکت Biofact، بر اساس پروتکل شرکت سازنده، استفاده گردید. با توجه به اینکه بازده واکنش بالای ۹۵ درصد بود؛ لذا برای انجام محاسبات از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده گردید.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای ژنهای VEGF و GAPDH

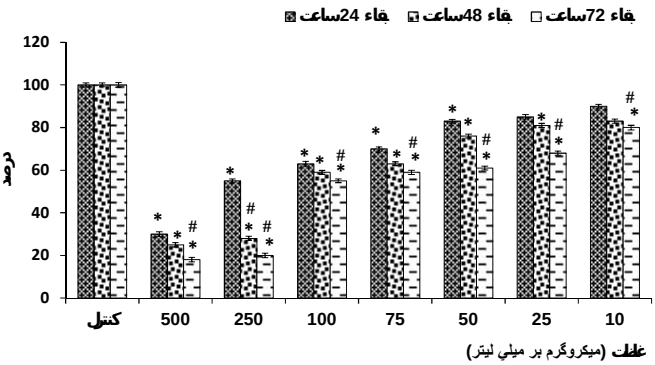
نام ژن	توالی پرایمر (reverse and forward)	طول محصول (bp)
VEGF	*AAATGCTTTCTCCGCTCTGA (F)* *CCCACTGAGGAGTCCAACAT (R)*	۱۷۳
GAPDH	*TGCACCACCAACTGCTTAGC (F)* *GGCATGGACTGTGGTCATGAG (R)*	۸۷

آنالیز آماری داده‌ها: به‌منظور بررسی آماری نتایج از نرم‌افزار SPSS-22 و Graphpad prism استفاده گردید. برای آنالیز آماری نتایج از تست‌های آماری ANOVA و Student's T-test در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

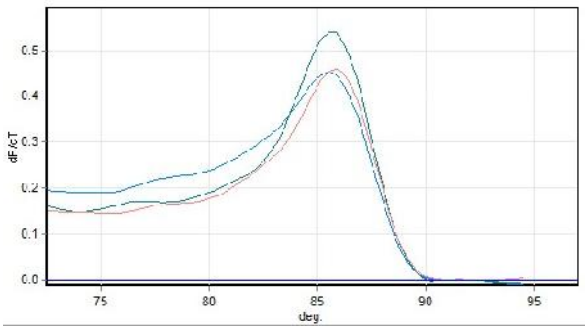
یافته‌ها

اثر عصاره پوست انار بر بقای سلول‌های سرطان تخمدان: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درصد بقای سلول‌های A2780 (Viability) با افزایش غلظت عصاره کاهش یافت که این کاهش درصد بقای سلولی با افزایش غلظت عصاره متناسب بود و در هر سه زمان به‌طور معنی‌داری در مقایسه با کنترل، کاهش بقاء مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$) (نمودار یک). از نظر میزان بقاء، کمترین درصد بقاء (۱۸ درصد) متعلق به غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان ۷۲ ساعت بود. در تمام زمان‌ها کاهش بقاء با افزایش دوز مشاهده گردید و اختلاف مشاهده شده بین غلظت‌های یکسان در زمان‌های مختلف نیز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (نمودار یک). همچنین IC50 به‌دست آمده برای عصاره در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ بود.

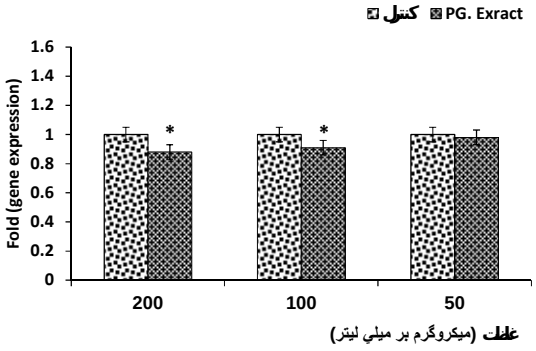
بررسی اثر عصاره پوست انار بر فاکتور رگ‌زایی *VEGF*: برای بررسی اثر عصاره بر بیان ژن *VEGF*، از روش qRT-PCR استفاده شد. در نمودار ۲ می‌توان منحنی ذوب ژن مورد مطالعه را مشاهده نمود.



نمودار ۱: میزان بقای سلول‌های A2780 پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت
** معنی‌داری کاهش بقاء در مقایسه با کنترل (P<۰/۰۵)*
 # معنی‌داری کاهش بقاء در مقایسه بین غلظت‌های مختلف (P<۰/۰۵)



نمودار ۲ : منحنی ذوب ژن VEGF در سلول‌های تیمار شده با عصاره پوست انار



نمودار ۳ : مقایسه میزان بیان ژن VEGF در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار با استفاده از روش Quantitative Real Time- PCR
** اختلاف آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵)*

نتایج آنالیز بیان ژن *VEGF*در سلول‌های تیمار شده با عصاره پوست انار نشان از کاهش میزان بیان این ژن داشت. در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره پوست انار میزان کاهش بیان ژن *VEGF* به ترتیب ۷ درصد، ۱۶ درصد و ۱۹ درصد به‌دست آمد که این کاهش بیان در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۳).

بحث

با توجه به آنالیز شیمیایی انجام شده مطالعه حاضر بر روی پوست انار، نتایج نشان می دهد که پوست انار دارای ترکیبات فلاونوئیدها، الکالوئیدها ویتامین C، ساپونین‌ها و دیگر ترکیبات مفید و موثر است. همچنین این مطالعه نشان داد که عصاره پوست انار دارای مقدار بالایی از ترپنوئیدها است. در مطالعه Yang و Dou اثر ترپنوئیدها بر درمان سرطان اینگونه تبیین شد که ترپنوئیدها گروه بزرگی از مواد طبیعی هستند که در انواع زیادی از میوه‌ها و سبزیجات و گیاهان دارویی وجود دارند (۱۵). ساختار بعضی از این ترکیبات شبیه هورمون‌های انسانی است. دی‌ترپنوئید پاکلی تاکسل (Paclitaxel) و آنالوگ نیمه سنتتیک آن دوسه تاکسل (dosetaxel) برای درمان سرطان پروستات و سرطان پستان وابسته به هورمون استفاده می‌شوند (۱۶). این ترپنوئیدها قادر به مهار رشد سلولی تومور و القای مرگ سلولی با مهار فاکتورهای خاص سرطان شامل proteasome، NF-κB و پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 هستند (۱۵) لذا انار یک منبع طبیعی از ترکیبات فنلی است که حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون تانن، پلی فنل، فلاونوئید و ویتامین است. سایر آنتی‌اکسیدان‌های انار شامل توکوفرول‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند که خواص پیشگیرنده و درمانی آنها به اثبات رسیده است (۱۷). نتایج مطالعه حاضر نیز موید همین مطلب بود.

نتایج حاصل از این مطالعه به‌طور کلی، اثرات مهاری عصاره پوست انار را بر رده سلولی سرطان تخمدان نشان داد. Mehta و Lansky خاطرنشان کردند که پلی‌فنل‌های حاصل از آبمیوه تخمیر شده انار اثرات ضدسرطانی روی سلول‌های سرطانی پستان داشته و همچنین روغن دانه انار در مقایسه با پلی‌فنل‌های حاصل از آبمیوه فعال‌تر هستند (۱۸). میوه انار، آبمیوه انار، دانه انار و روغن دانه آن در سرطان‌های پروستات، پستان، پوست، روده بزرگ، شش، سرطان‌های دهانی و لوسمی از طریق مکانیسم عمل آنتی‌اکسیدان‌ها، عوامل ضدتکثیر سلولی، توقف رشد، بر هم زدن چرخه سلولی و مرگ سلولی، ضدرگزایی و ضدالتهاب فعالیت دارند (۱۹و۲۰). به‌علاوه در مطالعه عسکری و همکاران عصاره پوست انار با القای اثر سایتوتوکسیک خود سبب کاهش قابل توجه بقاء در سلول‌های سرطان پستان گردید (۲۱). Song و همکاران نشان دادند که پلی‌فنل‌های موجود در عصاره پوست انار می‌توانند با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی باعث القای اثرات ضدتکثیری در سلول‌های سرطان کبد شوند. به‌علاوه با متوقف کردن سلول‌های سرطانی در فاز S از سیکل سلولی، از ورود سلول‌های سرطانی به فاز تقسیم ممانعت کرده و با القای مسیر آپوپتوزی میتوکندریایی و افزایش بیان کاسپاز ۹ باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کبد می‌شوند (۱۱). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نیز ضمن تأیید

مطالعات پیشین، نشان می‌دهد که عصاره پوست انار در سرطان تخمدان نیز از طریق مکانسیم عمل آنتی‌اکسیدان‌ها فعالیت سایتوتوکسیک و ضدرگزایی دارد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره انار بر بیان عامل رگزایی (*VEGF*) اثر داشته و سبب کاهش معنی‌داری در بیان این ژن می‌شود. در تأیید این یافته، مطالعه Lee و همکاران که روی اثرات ضدالتهابی انار انجام شد؛ در شرایط in vitro و in vivo روی رده‌های سلولی سرطان پستان نشان داد که ترکیبات انار مانع از رگزایی، حالت تهاجمی و القای مرگ سلولی می‌شوند (۲۲).

Sreekumar و همکاران نشان دادند که ترکیبات شیمیایی انار تهاجم سلولی تومور به بافت طبیعی و متاستاز به مکان‌های دور را به حداقل می‌رسانند و این اعمال به‌واسطه توقف فعالیت متالوپروتئیناز انتخابی، کاهش فعالیت کینازی کانون چسبندگی و کاهش بیان *VEGF* انجام می‌شود (۷). Dana و همکاران نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطان پوست (ملانوما) با غلظت‌های ۲۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره پوست انار سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن *VEGF* در این سلول‌ها شده است (۲۳). این موضوع نشان دهنده اثر عصاره پوست انار بر سرکوب عوامل رگزایی است که نتایج مطالعه حاضر نیز مؤید همین مسأله است.

قابلیت بالای بقاء، تهاجم و متاستاز از مشخصه‌های بیولوژیک تومورهای بدخیم و علت عمده عوارض جسمی و مرگ و میر ناشی از سرطان است. ادامه رشد نئوپلاسم اولیه و متاستاز بستگی به خونرسانی کافی به آن منطقه دارد. لذا، القای مرگ سلولی ناشی از خاصیت سایتوتوکسیک و مهار رگزایی به عنوان عوامل موثر و کمک‌کننده در درمان سرطان شناخته می‌شوند. در نتیجه، مطالعه‌های محققان برای تشخیص مکانیسم مولکولی و عوامل دخیل در این فرآیند، می‌تواند زمینه‌ساز توسعه راه‌های درمانی باشد. ترکیبات موجود در پوست انار دارای فعالیت توکسیک علیه سلول‌های سرطان تخمدان است و به علاوه، دارای خاصیت ضدرگزایی بوده و می‌توانند به عنوان عامل موثری در نابودی سلول‌های سرطانی در سرطان تخمدان معرفی شوند. به‌علاوه، با توجه به خواص منحصر به فرد عصاره پوست انار، پیشنهاد می‌گردد که اثرات ضدسرطانی و ضدرگزایی این عصاره بر روی انواع دیگری از سرطان‌ها در شرایط in vitro و in vivo نیز بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره پوست انار به واسطه دارا بودن ترکیبات متعدد و خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌تواند سبب القای اثر سمیت بر سلول‌های سرطان تخمدان شده و احتمالاً با کاهش بیان عامل رگزایی می‌تواند سبب کاهش متاستاز و تظاهرات بدخیمی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۴۵/ع/ز) خانم فاطمه زمانی عصمتی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم دانشگاه علم و هنر یزد بود. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از شرکت دانش‌بنیان ریز زیست فناوران فردانگر اعلام می‌دارند.

References

1. Marjani M. [Epidemiology and risk factors of ovarian cancer]. Iran J Obstet Gynecol Infertil. 2010; 5(3): 67-73. [Article in Persian]

2. Noori-Daloii MR, Rashvand Z. [Molecular Genetics and Gene Therapy in Ovarian Cancer]. Horizon Med Sci. 2010; 16(3): 5-19. [Article in Persian]

3. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol. 1994 Mar; 12(3): 441-43. DOI: 10.1200/jco.1994.12.3.441

4. Banerjee S, Kaye SB. New Strategies in the Treatment of Ovarian Cancer: Current Clinical Perspectives and Future Potential. Clin Cancer Res. 2013 Mar; 19(5): 961-68. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2243

5. Aminimoghaddam S, Norouzi S. [Ovarian failure due to cancer treatment and fertility preservation options]. Tehran Univ Med J. 2016; 74(1): 1-8. [Article in Persian]

6. Mousavi A, Karimi-Zarchi M, Behtash N, Mokhtari-Gorgani M, Mehrdad N, Rouhi M, et al. [The effect of consolidation treatment with intraperitoneal carboplatin in advanced epithelial ovarian cancers]. Tehran Univ Med J. 2014; 72(4): 215-21. [Article in Persian]

7. Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. Biomed Res Int. 2014; 2014: 686921. DOI: 10.1155/2014/686921

8. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. Cancer Metastasis Rev. 2012 Jun; 31(1-2): 143-62. DOI: 10.1007/s10555-011-9337-5

9. Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Hassani ME, Wiedow C, Buck E, et al. Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. Physiol Mol Biol Plants. 2011 Jul; 17(3): 305-11. DOI: 10.1007/s12298-011-0070-x

10. Zamani Z. [Characteristics of Pomegranate Cultivars Grown in Saveh of Iran]. MSc Thesis. University of Tehran. 1990. [Persian]

11. Song B, Li J, Li J. Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. Food Chem Toxicol. 2016 Jul; 93: 158-66. DOI: 10.1016/j.fct.2016.04.020

12. Loizzi V, Del Vecchio V, Gargano G, De Liso M, Kardashi A, Naglieri E, et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. Int J Mol Sci. 2017 Sep; 18(9) pii: E1967. DOI: 10.3390/ijms18091967

13. Choi HJ, Armaiz Pena GN, Pradeep S, Cho MS, Coleman RL, Sood AK. Anti-vascular therapies in ovarian cancer: moving beyond anti-VEGF approaches. Cancer Metastasis Rev. 2015 Mar; 34(1): 19-40. DOI: 10.1007/s10555-014-9538-9

14. Keshavarzi M, Esfandani Bozchaloyi S, Kiarostami K. [Pharmagnosy, total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts of

6 Stellaria species and two related genera in Iran]. Applied Biology. 29(1): 143-58. [Article in Persian]

15. Yang H, Dou QP. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. Curr Drug Targets. 2010 Jun; 11(6): 733-44.

16. Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in Escherichia coli. Science. 2010 Oct; 330(6000): 70-74. DOI: 10.1126/science.1191652

17. Gil MI, Tomás-Barberán 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 Oct; 48(10): 4581-89. DOI: 10.1021/jf000404a

18. Mehta R, Lansky EP. Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (Punica granatum) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. Eur J Cancer Prev. 2004 Aug; 13(4): 345-48. DOI: 10.1097/01.cej.0000136571.70998.5a

19. Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. J Clin Oncol. 2009 Jun; 27(16): 2712-25. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.6235

20. Faria A, Calhau C. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011 Aug; 51(7): 626-34. DOI: 10.1080/10408391003748100

21. Askari M, Nikoonahad Lotfabadi N. [Evaluation of niosomal nano-carriers capabilities on toxicity preservation and delivery of pomegranate peel extract in cell culture conditions (MCF-7 cell line of breast cancer)]. Daneshvar. 2018; 26(5): 9-20. [Article in Persian]

22. Lee CJ, Chen LG, Liang WL, Wang CC. Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne invitro and in vivo. Food Chemistry. 2010; 118(2): 315-22. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.123

23. Dana N, Javanmard SH, Rafiee L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of black pomegranate peel extract on melanoma cell line. Res Pharm Sci. 2015 Mar-Apr; 10(2): 117–24.