مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۷. شماره ۳. پاییز ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر عصاره متانولی پوست انار بر القای سمیت سلولی و بیان ژن PDGF در رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela)

سارابانو ترکمان[۱]، نرگس نیکونهاد لطف آبادی[۱*]، بی بی فاطمه حقیرالسادات[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران
۲. گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: عصاره پوست انار با برخورداری از ترکیبات سیتوتوکسیک نظیر پلی فنل‌ها می‌تواند به عنوان عامل موثر و مناسب برای پیشگیری و جلوگیری از سرطان مطرح باشد. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پوست انار و برآورد میزان سمیت آن بر رده سلولی سرطان گردن رحم و تاثیر آن بر بیان ژن رگزایی انجام شد.

روش‌ها: در پژوهش حاضر عصاره گیری پوست انار بصورت کیفی توسط دستگاه سوکسله صورت گرفت و ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آن شناسایی گردید. میزان سمیت این عصاره بر رده سلولی Hela در غلظت‌ها و در زمان‌های مختلف، به روش MTT ارزیابی شد. سپس با استفاده از روش Real-time PCR میزان بیان ژن PDGF به روش کمی در سلول‌های تیمار شده ارزیابی و از نظر آماری با نرم افزار SPSS**نسخه ۲۱** جهت بررسی تاثیر عصاره از مدل خطی تعمیم یافته و آزمون چند دامنه ای دانکن جهت معنی داری داده ها استفاده شد.

نتایج: تست‌های فیتوشیمیایی تایید کننده وجود ترکیبات متنوعی از جمله پلی فنل‌ها در عصاره متانولی پوست انار است. نتایج تست MTT نشان میدهد که عصاره پوست انار در غلظت‌های مختلف دارای خاصیت ضد توموری است. بررسی بیان ژن نشان میدهد که این عصاره باعث کاهش بیان ژن PDGF در رده سلولی سرطانی Hela می‌شود (**P=۰/۰۴**).

نتیجه‌گیری: عصاره پوست انار با برخورداری از اثرات ضد توموری و سایتوتوکسیک در سرطان دهانه رحم، می‌تواند از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی ممانعت کرده و احتمالا عامل موثری در جهت پیشگیری از رشد و گسترش سلول‌های سرطانی باشد.

کلید واژه‌ها:
پوست انار، رگ زایی، ژن PDGF، ضد سرطان

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

سلول‌های توموری بخشی از سلول‌های بدن می‌باشند که توانایی تنظیم تکثیر خود را از دست داده و بنابراین به مقدار نامحدود تکثیر می یابند. از این رو این سلول‌ها جهت تامین اکسیژن و مواد مغذی مورد نیاز خود از طریق فرآیندی که بسیار به رگ زایی طبیعی شبیه است، تشکیل رگ‌های جدید را از شبکه مویرگی موجود القا می‌کنند. در واقع با افزایش اندازه تومور، محیط سلول‌های توموری هیپوکسیک و اسیدیک شده و شروع به افزایش تولید فاکتورهای رشد می‌کنند که در نتیجه آن، رگ‌های خونی موضعی تشکیل می‌شود (۱، ۲).

در یک مطالعات اثر عصاره پوست انار بر ژن های تحریک کننده متاستاز از جمله MMP9, Fibronectin و VEGF در رده سلولی پستان بیانگر کاهش بیان این ژن ها و کاهش متاستاز سلول‌های توموری است. به نظر می رسد، عصاره پوست انار می‌تواند به عنوان یک عامل مهارکننده مناسب جهت

*آدرس نویسنده مسئول: یزد، دانشگاه علم و هنر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
آدرس پست الکترونیک: nikounahad_1976@yahoo.com

ممانعت از انتشار سلول‌های توموری محسوب گردد (۳). همچنین ژن PDGF عامل مهمی است که در رگ زایی و پیشرفت سرطان نقش کلیدی دارد و به همین دلیل بررسی میزان بیان این ژن در تحقیقات سرطان از اهمیت بالایی برخوردار است (٤). سرطان گردن رحم از رشد فزاینده و نامنظم سلول‌های اپیتلیالی دهانه رحم و ریزش مداوم این سلول‌ها حاصل می‌شود. این بیماری چهارمین سرطان و چهارمین عامل مرگ و میر حاصل از سرطان در زنان می‌باشد؛ به گونه‌ای که در سال ۲۰۱۲، از ۵۲۸۰۰۰ مورد از ابتلا به این سرطان، ۲۲٦۰۰۰ مورد به مرگ منتهی شده است. به طور معمول ۷۰٪ از موارد سرطان دهانه رحم در کشورهای توسعه یافته اتفاق می‌افتد که حدود ۸ ٪ از کل مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها را شامل می‌شود (۵-۷).

سرطان دهانه رحم در ایران دومین سرطان شایع، پس از سرطان پستان و پنجمین سرطان کشنده‌ی زنان بوده و رتبه ۱۱ در بین کل سرطان‌های زنان ایرانی را تشکیل میدهد (۸). استفاده از روش‌های رایج برای درمان سرطان از جمله، شیمی درمانی اگرچه توانسته است تاحدودی از پیشرفت رو به افزایش این بدخیمی کشنده بکاهد، ولی عوارض جانبی فراوان ناشی از این روش‌ها، چالشی بزرگ در درمان سرطان است. از این‌رو محققان در جستجوی ترکیبات طبیعی با ویژگی‌های ضد سرطانی هستند تا از این طریق بتوانند با کاهش عوارض جانبی روشهای سرطان درمانی، کیفیت زندگی مبتلایان به سرطان را افزایش دهند. در این میان گیاهان دارویی با برخورداری از ترکیبات ضد توموری می توانند جانشین مناسبی برای ترکیبات شیمی درمانی جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی باشند (۹، ۱۰).

انار با نام علمی Punica granatum L متعلق به خانواده Punicaceae، به عنوان یکی از قدیمی ترین میوه‌های خوراکی است که کاربرد گسترده ای در طب سنتی بسیاری از تمدن‌ها داشته است. این میوه بومی ایران است که به طور گسترده در ایران هند و ایالات متحده و به مقدار کمتر در بیشتر کشورهای خاورمیانه و خاور دور کشت می‌شود. ترکیبات پلی فنلیک انار، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است و از رشد سلول های سرطانی ممانعت می نماید (۱۰). گزارشات پژوهشی زیادی مبنی بر فعالیت آنتی اکسیدانی قوی عصاره قسمت های مختلف انار ارائه شده است (۱۲، ۱۳) که در این میان عصاره پوست انار، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی است که با میزان بالای ترکیبات فنلی موجود در این بخش از جمله ترکیب فنولی الاژیک اسید (Ellagic acid) همبستگی دارد (۱۲، ۱۳). مطالعه حاضر با هدف شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پوست انار و برآورد میزان سمیت آن بر رده سلولی سرطان گردن رحم و تاثیر آن بر بیان ژن رگزایی انجام شد.

روش‌ها

عصاره گیری از پوست انار: پوست انار بعد از شستشو جدا شده و در شرایط مناسب دمایی و دور از نور خورشید خشک، و سپس با استفاده از دستگاه سوکسله (Soxhlet) عمل عصاره گیری از پوست انار انجام شد. بدین منظور از مخلوطی از متانول ۸۰٪)، آب مقطر (۱۹٪) و اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال (۱٪) به عنوان حلال با نسبت ۱:۱۵(حلال به نمونه) استفاده گردید. مقداری پودر پوست انار به همراه حلال در ارلن متعلق به دستگاه سوکسوله ریخته شده و بین ٦ تا ۱۰ ساعت عصاره گیری انجام شد. سپس عصاره حاصل به بشر منتقل شده و توسط کاغذ واتمن فیلتر شد. پس از این مرحله عصاره ی حاصل به منظور تبخیر حلال داخل حمام آب گرم در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از تبخیر کامل حلال عصاره ی به دست آمده جمع آوری شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره پوست انار: با استفاده از معرف های خاص، ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره پوست انار از جمله تانین ها، استروئید، فنل ها، فلاونوئید، تری ترپنوئیدها، آلکالوئید، ساپونین، فلوباتانین، ویتامین C، پروتئین‌ها، گلیکوزید، استرول بررسی گردید. برای تایید وجود این مواد در عصاره

پوست انار از تست های استاندارد با استفاده از معرف خاص و یا روش خاص استفاده شد (۱٤).

رده سلولی و محیط کشت: این مطالعه در محیط آزمایشگاه و با استفاده از رده سلولی سرطان گردن رحم (Hela) انجام شد. ردهی سلولی Hela از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه گردید. سلول‌های این ردهی سلولی در محیط کشت RPMI-1640 ، ۱۰٪ درصد FBS، در دمای ۳۷ °C با فشار ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند.

تعیین سمیت سلولی و زنده مانی سلول: در مطالعهی حاضر جهت بررسی سمیت سلولی از روش سنجش MTT استفاده شد. به منظور اندازهگیری سمیت عصاره متانولی پوست انار، سلول های سرطان گردن رحم (Hela) به طور جداگانه به میزان 10^4 سلول در هرچاهک از پلیت ۹٦ تایی ریخته شد و به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس، غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره پوست انار تهیه شده و سلول های موجود در پلیت ۹٦ خانه با این غلظت ها برای زمان های ۲٤، ٤۸و۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت زمان تیمارهای مورد نظر، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلیگرم بر میلیلیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و بهمنظور حل شدن کریستال‌های فورمازون ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطهی زیر درصد زندهمانی سلولها محاسبه گردید.

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری بلانک} - \text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times ۱۰۰$$

محاسبه IC50 عصاره پوست انار: برای محاسبه غلظتی که در آن عصاره پوست انار باعث کاهش ۵۰٪ بقای سلولی بوده است(IC_{50}) از نرم افزار Origin استفاده شد. برای این منظور مقادیر غلظت‌ها و درصد بقا به نرم افزار Origin داده شد و پس از رسم نمودار برای هر ساعت و طبق غلظت‌های در نظر گرفته شده محاسبات مورد نظر انجام و IC_{50} محاسبه شد.

استخراج و کنترل کیفیت RNA: در پژوهش حاضر به منظور استخراج RNA از کیت ستونی (شرکت دنا زیست، مشهد، ایران) استفاده و طبق پروتکل کیت مورد نظر مراحل استخراج RNA به روش ستونی انجام گردید. به منظور بررسی کمی RNA استخراج شده از نظر غلظت و میزان خلوص نانو دراپ استفاده شد و نسبت هایی که از نانو دراپ دریافت شد نشان دهنده خلوص RNA بود. به منظور ممانعت از وجود آلودگی DNA ژنومی و جواب مثبت کاذب، با استفاده از آنزیم DNaseI (Fermentas, USA) عاری از RNase عمل DNA زدایی صورت گرفت.

سنتز cDNA: این مرحله توسط کیت سنتز cDNA (شرکت پارس طوس، مشهد، ایران) و دستگاه PCR انجام گرفت. سنتزcDNA بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت صورت پذیرفت.

فرایند Real-time PCR و بررسی میزان بیان ژن: از آزمون Real-time PCR برای آنالیز کمی بیان ژن PDFG استفاده شد. مواد مورد نیاز برای این آزمون عبارتند از نمونه های cDNA، Primer (آغازگرها)،SYBR Grean Master Mix و آب مقطر استریل که حجم نهایی محلول حاصل ۲۰ میکرولیتر میباشد. در این فرآیند از GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و چرخه دمایی واکنش qRT-PCR بهصورت: ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و طی ٤۰ سیکل دمایی شامل ۹٤ درجه سانتیگراد ۵ ثانیه و ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۵ ثانیه انجام گرفت و در نهایت به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از بررسی منحنی ذوب و کنترل کیفی دما و بیان ژن موردنظر در qRT-PCR با توجه به راندمان بالای ۹۵٪ میزان CT ژن مورد بررسی و همچنین کنترل داخلی وارد فرمول Pfaffl شد (۱۵) و میزان بیان ژن موردنظر به صورت نسبتی گزارش شد.

به منظور اطمینان از عدم حضور آلودگی DNA ژنومی در نمونهی RNA، از کنترل منفی RT minus و به منظور اطمینان از عدم آلودگی اگزوژن از NTC (Non-template control) در

فرآیند Real time PCR استفاده گردید. سپس محصول فرآیند روی ژل آگارز لود شد. در این مرحله باندی در روی ژل الکتروفورز جهت آلودگی با DNA ژنومی و یا آلودگی اگزوژن مشاهده نشد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی آغازگر 5'→3'	طول محصولPCR	تعداد سیکلهای Real-Time PCR
PDGF	F: GCCAGGTTGTCTCCTGGTTA R: TGCTTGGGACACATTGACAT	۸٦ bps	٤۰
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	۸۷ bps	٤۰

تحلیل آماری داده ها: در این مطالعه تحلیل آماری داده ها به وسیله نرم افزار نسخه SPSS ۲۲ انجام شد و از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵٪ و مدل آماری خطی تعمیم یافته GLM با در نظر گرفتن یک متغیر وابسته و متغیر های مستقل استفاده گردید. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. از نظر رعایت اصول اخلاقی حفاظت از آزمودنی‌های انسانی، موضوع و روش انجام پژوهش بررسی شده و به تصویب رسید.

نتایج

بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی و سایتوتوکسیتی عصاره پوست انار بر سلول‌های Hela: بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره پوست انار مثبت ارزیابی گردید (تصویر ۱-a) و نتایج MTT تیمارهای عصاره پوست انارباغلظت های مختلف بر روی سلول‌های Hela در ۲٤ ساعت تیمار با عصاره نشان می‌دهد که بقای سلول ها از غلظت ۱۰۰۰ تا ۲۵۰میکرو گرم بر میلی لیتر کاهش یافته و دوباره از غلظت ۲۵۰ تا ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر کاهش بقا مشاهده می شود (تصویر ۱-b) و کمترین میزان بقا در ۲٤ ساعت در غلظت ۲/۵ عصاره پوست انار مشاهده شد. طبق آنالیز آماری انجام شده تغییرات بقای ناشی از تمامی غلظت ها نسبت به گروه کنترل معنی دار می‌باشد (P=0.001). نتایج MTT تیمارهای عصاره پوست انار بر روی سلول‌های Hela در تیمار ٤۸ ساعته نشان داد که از غلظت ۱۰۰۰ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بقای سلول ها کاهش یافته است و سپس از غلظت ۷۵ تا ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر دوباره کاهش بقای وابسته به دوز نشان داده شد و بر اساس آنالیز آماری داده های ٤۸ ساعت، کاهش بقای مشاهده شده توسط همه غلظت های اعمال شده نسبت به گروه کنترل معنی دار می‌باشد(P=۰/۰۰۱). همچنین نتایج MTT تیمارهای عصاره پوست انار طی ۷۲ ساعت نشان داد که از غلظت ۱۰۰۰ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بقای سلول ها کاهش یافته است و سپس از غلظت ۷۵ تا ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر دوباره کاهش بقای وابسته به دوز نشان داده شد. تحلیل آماری تیمارهای اعمال شده در ۷۲ ساعت نشان می دهد که کاهش بقای القا شده در همه غلظت ها نسبت به گروه کنترل معنی دار می‌باشد (P=۰/۰۰۱).

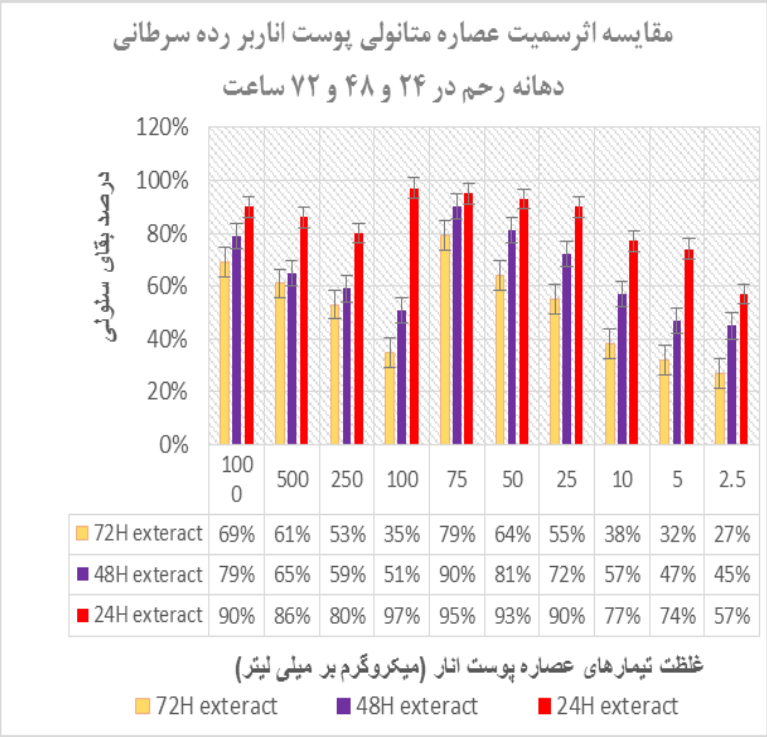
طبق تحلیل آماری آزمون چند دامنه ای دانکن (تصویر ۱-b) بین همه غلظت ها و گروه کنترل طی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت ارتباط معنی داری وجود داشته است (P=۰/۰۰۱).

میزان IC50 عصاره پوست انار: با استفاده از گراف‌هایی که با استفاده از نرم افزار origin 2018 از غلظت های مختلف پوست انار در ٤۸ و ۷۲ ساعت، میزان IC_{50} غلظت های عصاره پوست انار در غلظت های ۲۰۰، ۱۰۰ و ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

کنترل کیفی RNA: بررسی کنترل منفی RT و نتایج NTC نشان می‌دهد که هیچگونه آلودگی حاصل از DNA ژنومی و اگزوژن در RNA استخراج شده وجود نداشت.

نوع ترکیب تست شده	نتیجه تست
ساپونین	+
فلوباتانین	+
ویتامین c	+
پروتئین ها	+
گلیکوزی	+
استرول	+
تانین	+
استروئید	+
ترکیبات فنلی	+
فلانوئید ها	+
تری ترپنوئیدها	+
آلکالوئید ها	+

A



B

تصویر ۱. (a) نتایج تست ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره پوست انار، (b) نمودار بررسی میزان سمیت عصاره پوست انار بر رده سلولی سرطان رحم طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلافات بقا در تمامی گروه ها با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$)

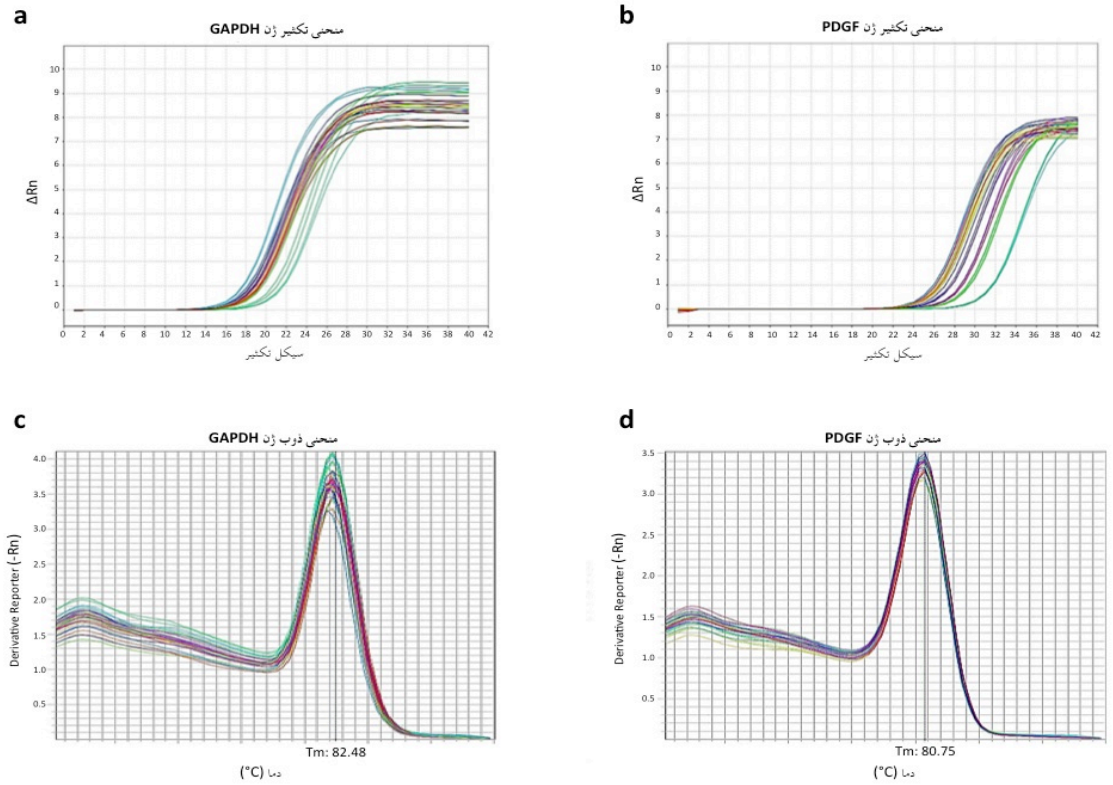
ارزیابی بیان ژن PDGF : از منحنی تکثیر محصولات بر حسب سیکل‌های PCR می‌توان دریافت که در ۲۳ سیکل اول در میزان محصولات تکثیر شده تغییر محسوسی ایجاد نمی‌شود، اما در ادامه، از سیکل ۲٤ به بعد، واکنش وارد فاز افزایشی یا Exponential می‌شود (تصاویر ۲- a و b). بررسی منحنی ذوب نمونه‌ها برای ژن های مورد بررسی نشان می‌دهد که منحنی-های ذوب همگی بر هم منطبق هستند و قله‌های دمایی همه نمودارهای روی یک دما قرار دارند (تصاویر ۲ – c و d).

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن هدف (PDGF) توسط تکنیک PCR Real Time در سلول های سرطان گردن رحم (Hela) که در معرض غلظت های ۲۰۰،۱۰۰،۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از عصاره پوست انار قرار گرفته اند نشان می‌دهد که در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، میزان بیان نسبی ژن ۰/۲٦، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۰/۳٦ و برای غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر ۰/۹۰ محاسبه شد. در تحلیل آماری انجام شده در بخش MTT بین این غلظت های ۱۰،۱۰۰،۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر ارتباط معنی داری وجود داشت ($P=0.001$) و در قسمت بیان ژن نیز این ارتباط از نظر آماری به صورت معنی دار بود ($P=0.004$). بنابراین کاهش بیان ژن در این غلظت ها قابل توجیه است.

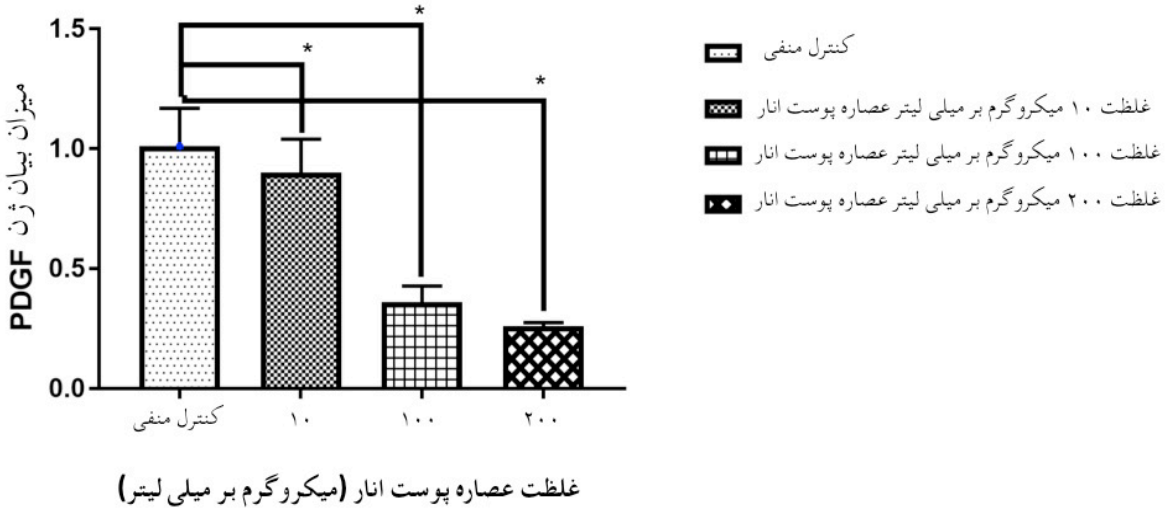
با نظر به اینکه PDGF، ژن موثر در رگزایی است که از عوامل موثر در متاستاز و گسترش سرطان می‌باشد، لذا تغییرات در بیان ژن ارتباط مستقیمی با بقای سلول ها نداشت. لذا، تغییرات بیان ژن مورد نظر مستقل از تغییرات بقای سلول‌ها بوده و کاملا قابل توجیه می باشد.

بررسی آماری داده ها نشان می دهد که نتایج حاصل از بیان ژن PDGF تحت تاثیر عصاره پوست انار، نسبت به نمونه کنترل معنی دار بوده است($P=۰/۰۰٤$) (تصویر ۳) و قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار می تواند سبب کاهش بیان عامل رگزایی (PDGF) شود. بعلاوه با افزایش غلظت میزان کاهش بیان ژن مورد نظر افزایش می یابد ($P=۰/۰۰٤$). در این بخش از مطالعه در تحقیقات آتی میتوان اثر عصاره پوست انار را بر روی ژن های دیگری که عامل

رگ‌زایی می‌باشند در این رده سلولی و رده های دیگر سلول های سرطانی مورد بررسی قرار داد.



تصویر ۲. (a) منحنی‌های تکثیر ژن GAPDH در گروه‌های مورد مطالعه. (b) منحنی‌های تکثیر ژن PDGF در گروه‌های مورد مطالعه. (c) منحنی ذوب ژن GAPDH در گروه‌های مورد مطالعه. (d) منحنی ذوب ژن PDGF در گروه‌های مورد مطالعه



تصویر ۳. نتایج حاصل از آزمون REAL TIME PCR در غلظت های مختلف عصاره پوست انار برای ژن PDGF. تغییرات بیان ژن PDGF پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظتهای مختلف عصاره پوست انار ($P<0.05$)

بحث

در پژوهش حاضر ضمن بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پوست انار، وجود ترکیباتی نظیر فنول‌ها، آلکالوئید ها، تری ترپنوئیدها، ویتامین C، پروتئین‌ها، گلیکوزیدها، استرول‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئید، تانن‌ها و استروئیدها در عصاره پوست انار مشخص شد. همچنین مشخص شد که عصاره پوست انار با برخورداری از خواص ضد توموری، در غلظت‌های مختلف مانع رشد و تکثیر سلولهای سرطانی در زمانهای مختلف گردید. علاوه بر این، پژوهش حاضر نشان داد که عصاره انار در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر باعث کاهش بیان ژن PDGF می‌شود.

تاکنون پژوهش‌هایی در رابطه با تأثیر عصاره‌های گیاهی از جمله عصاره انار بر القای سمیت سلولی بر سلولهای سرطانی صورت گرفته است (۱۶، ۱۸). در یک بررسی اثر عصاره الکلی پوست انار بر سلول های سرطان پستان (MCF7) انجام گردید و نتایج حاصله وجود ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی پوست انار را تایید و نشان داد که عصاره پوست انار می تواند با دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی خواص سایتوتوکسیک از خود نشان داده و سبب کاهش بقای سلول های سرطان پستان شود. نتیجه این پژوهش همانند پژوهش حاضر تاییدی بر فعالیت سایتو توکسیک عصاره پوست انار می باشد (۱۶).

در مطالعه دیگری ویژگی های آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پوست انار بررسی گردید و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترکیبات فنلی عصاره ویژگی ضد رادیکالی آن افزایش پیدا کرده و همبستگی معنی داری بین ویژگی ضد رادیکالی و قدرت احیاءکنندگی عصاره متانولی پوست انار وجود دارد. نتایج نشان داد عصاره متانولی پوست انار سرشار از ترکیبات فنولی بوده و خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی دارد (۱۷).

همچنین مشخص گردید که عصاره پوست انار موجب مهار فعالیت میلوپراکسیداز نوتروفیل ها شده و تخفیف التهاب ریه ناشی از لیپوپلی ساکارید را در موش به دنبال دارد (۱۸).

در پژوهش مشابهی، خواص ضد سرطانی، ضد جهش زایی و آنتی اکسیدانی تک تک اجزایی استخراج شده از پوست انار مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

همچنین پژوهش دیگری بر روی اثر عصاره پوست انار در رده های مختلف سلولی انجام شده است، با توجه به ترکیبات فنلی قوی و ظرفیت آنتی اکسیدانی بالایی که برای عصاره پوست انار بیان شده اثر سایتوتوکسیک غلظت های مختلف۵ تا ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر این عصاره بر روی سرطان‌های مختلف شامل سرطان ریه، سرطان تخمدان، سرطان پروستات و سرطان پستان بررسی شد و نتایج پژوهش آن‌ها در سرطان-های مختلف IC_{50} در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر ارزیابی شد و بیشترین میزان کاهش بقا در سرطان پستان و کمترین آن در سرطان تخمدان مشاهده شد (۲۰).

برخی پژوهشگران اثر عصاره پوست انار سیاه را بر رده سلولی ملانوما و اندوتلیال بند ناف انسان بررسی و نشان دادندکه عصاره پوست انار سیاه باعث القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده و تغییر شکل سلولهای ملانوما می شود در حالیکه بر رده سلولی اندوتلیال بند ناف چنین اثری مشاهده نشد (۲۱).

به علاوه اثر عصاره استونی دانه انار بر بیان پروتئین های β-catenin و E-cadherin در سلول‌های سرطانی PC-3 مورد ارزیابی و مشخص گردید که عصاره استونی میوه انار قادر است حیات سلول‌های PC-3 را بخصوص در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر مهار کند. همچنین تیمار سلول‌های PC-3 با غلظت‌های۲۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره استونی میوه انار موجب افزایش مقدار پروتئین β-catenin و E-cadherin به میزان تقریبی ۱/۵ و ۲/۲ برابر می‌شود (۲۲).

در بررسی متون نتایج مشابهی برای این تحقیق بدست نیامد تا بتوان به آن‌ها مراجعه کرد، اما مطالعات مشابه دیگری که بر روی عصاره های گیاهی دیگر و سرکوب عوامل آنزیوژنیک مطرح شده به عنوان نمونه میتوان به تحقیقاتی برخی از

محققان که اثر مهاری عصاره زنجبیل را که دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی بود بر روی فاکتورهای آنژیوژنز NF-kB ، VEGF و IL-8 بررسی کردند، اشاره کرد. این پژوهشگران نشان دادند که ترکیب آنتی اکسیدان گیاهی بر روی فاکتورهای آنزیوژنیک بیان شده در سه رده سلولی سرطانی متفاوت از تخمدان اثر مهاری دارد که این اثر مهاری بر روی NF-kB بیشتر از VEGF و IL-8 می باشد (۲۳).

با توجه به نقش مهم PDGF در فرآیند رگزایی، در خصوص مکانیسم عملکرد آن در تومورهای سرطانی مطالعاتی انجام شده است (٤). با نظر به اثرات آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال های آزاد عصاره پوست انار و همچنین با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، وجود ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره پوست انار به اثبات رسید. علاوه بر آن در طی این مطالعه، اثر این عصاره بر میزان زنده‌مانی سلول های سرطان گردن رحم (رده Hela) ارزیابی شده و همچنین بیان ژن PDGF پس از اعمال تیمار با غلظت های مختلف عصاره پوست انار بر روی این سلول‌ها بررسی گردید. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان دادند که پس از ۷۲ ساعت تیمار سلول ها با غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار، با کاهش غلظت از ۱۰۰۰ تا ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر، کاهش معنی دار ($P<0.05$) بقای سلولی در سلول-های Hela مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که ممکن است غلظت های بالاتر عصاره پوست انار به عنوان تیمار، به علت وجود ترکیبات متنوع، احتمالا نقش یک ماده مغذی را برای سلول ها ایفا کرده و بنابراین موجب افزایش بقای سلول ها شده باشند. در حالیکه با کاهش غلظت عصاره پوست انار در تیمارهای سلولی، احتمالا نقش سایتوتوکسیک آن افزایش یافته است، به گونه ای که غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر، بیشترین میزان کاهش بقای سلولی را در سلول های سرطان دهانه رحم نشان داده است. تحلیل آماری نتایج تست MTT مربوط به تیمارهای ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر عصاره نشان داد که تغییرات مشاهده شده در میزان بقای حاصل از این غلظت‌ها معنی‌دار بوده ($P=0.001$) و در قسمت بیان ژن نیز، اختلاف در میزان بیان ژن، معنی دار می باشد ($P=0.004$). از آنجایی که در نتایج MTT کاهش بقای سلولی در ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشتر از غلظت ۱۰۰ و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره بیشتر از غلظت ۲۰۰ بوده است بنابراین کاهش بیان ژن در این غلظت ها قابل توجیه است. همان‌طور که در بخش نتایج بیان شد در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از عصاره نسبت به غلظت ۱۰۰ و در غلظت ۱۰۰ نسبت به غلظت ۱۰ کاهش بیشتری در میزان بیان ژن حاصل شد به این معنا که بیشترین کاهش بیان در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به دست آمد و این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار ($P<0.05$) بودند. با توجه به اینکه این غلظت ها از روی نتایج IC50 برای ارزیابی بیان ژن انتخاب شده و تغییرات ناشی از آنها در سطح ۵٪ از نظر آماری معنی‌دار می باشند، بنابراین می‌توان کاهش بیان ژن PDGF را در این غلظت ها توجیه کرد.

بر اساس نتایج حاصل می‌توان عصاره پوست انار را به عنوان یک ترکیب کمک درمانی با خواص ضدتوموری و قابلیت سرکوب عوامل رگ زایی در سلول‌های توموری، پیشنهاد کرد. امید است در تحقیقات آینده ضمن مطالعات بیشتر بر روی خواص ضدسرطانی آن، بیان ژنهای موثر در رگزایی مثل PDGF در سطح پروتئین بررسی شده و در مطالعات وسیع تر بر روی مدل حیوانی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. در مطالعات بعدی میتوان روش های دیگر عصاره گیری و اثر آن ها را بر درصد ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره پوست انار مورد بررسی قرار داده و اثر این عصاره را در دامنه وسیع‌تری از غلظت مطالعه نمود. همچنین می‌توان اثر تیمار با عصاره را در طی دوره‌های زمانی بیشتری بررسی کرد. به دلیل محدودیت هایی که در هزینه و زمان برای انجام این تحقیق وجود داشت امید است در مطالعات آتی ارزیابی اثر این عصاره بر روی رده های سلولی دیگر و حتی بر روی مدل حیوانی امکانپذیر گردد.

نتیجه‌گیری

پژوهشگران همواره در جستجوی کشف ترکیبات گیاهی با عوارض جانبی کمتر از دارو های شیمیایی برای پیشگیری از سرطان هستند. در پژوهش حاضر ضمن استخراج عصاره پوست انار، مشخص گردید که این عصاره با برخورداری از ترکیبات فیتوشیمیایی منحصر به فرد خود دارای سمیت قابل قبولی بر روی رده سلولی سرطان گردن رحم و باعث کاهش بیان ژن PDGF در این رده سلولی گردید، از این رو عصاره پوست انار را می‌توان احتمالا به عنوان عاملی موثر در جلوگیری از رشد سلول های سرطان دهانه رحم و کنترل عوامل رگ زایی که نقش مهمی در گسترش تومورهای سرطانی دارند پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی در سال ۱۳۹۷ می‌باشد و از نظر رعایت اصول اخلاقی حفاظت از آزمودنی های انسانی مورد تأئید می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و سپاس فراوان خود را از دانشگاه علم و هنر یزد که در امور انجام این پژوهش همکاری های لازم را به عمل آوردند ابراز می دارند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: سارابانو ترکمان، نرگس نیکونهاد لطف آبادی، بی بی فاطمه حقیرالسادات

(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: سارابانو ترکمان ، نرگس نیکونهاد لطف آبادی ، بی بی فاطمه حقیرالسادات

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: سارابانو ترکمان ، نرگس نیکونهاد لطف آبادی، بی بی فاطمه حقیرالسادات

References

1. Ruegg C. Leukocytes, inflammation,and angiogenesis in cancer: fatal attractions. Journal of Leukocyte Biology 2006;80(4):627-684.

2. Mostafaie A, Mohammadi H.R, Motlagh, Mansouri K**.** Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis. Yakhteh Medical Journal. 2010;11(4): 374-381.

3. Ahmadiankia N, Bagheri M, Fazli M. Gene Expression Changes in Pomegranate Peel Extract-Treated Triple-Negative Breast Cancer Cells. 2018; 7(1): 102-109.

4. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. J Cell Biol. 2007;177(3):489-500.

5. Kumar N. Cervical cancer; a nightmare for womanhood: review of recent advances. Journal of Womens Health and Gynecology. 2016; 2(2):1-9

6. Tarney CM, Han J. Postcoital bleeding: a review on etiology, diagnosis, and management. Obstetrics and gynecology international. 2014; 1(1): 1-8.

7. Small Jr W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, Jhingran A, Kitchener HC, Mileshkin LR, Viswanathan AN, Gaffney DK. Cervical cancer: a global health crisis. Cancer. 2017;123(13):2404-12.

8. Sharifi M, Mohammadi Z, Makvandi Z, Rostami P, Moradi A. Assessment of Cervical Cancer Screening and its Barriers in 18-50 Year Old Women Referring to Asad Abad Comprehensive Health Centers. Pajouhan Scientific Journal. 2018;16(2):35-45.

9. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. Cancer letters. 2008;267(1):133-64.

10. Rahimzadeh M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Arab SS, Mobasheri H. Study of Loading , Cytotoxicity , Uptake , and Release of Curcumin from a Novel Gemini Surfactant Nanocarrier. Pathobiol Res. 2016;19(1):13–27.

11. Hasanpour Fard M, Hassanzadeh Taheri M.M, Hosseini M , Ahani A , Ravanbakhsh N , Rabiei N , Ghoreishi S.A. Evaluation of anti-obesity and hypolipidemic effects of aqueous and ethanolic extracts of Pomegranate Peel in male Wistar Rats. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 22 (1): 39-47

12. Tarkhasi A, Zakipour Rahimabadi E, Alizadeh doughikollaee E , Elahi M.Y. Effect of edible coating containing pomegranate (Punica granatum) peel extract on the quality and shelf life of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) fillet during refrigerated storage. Journal of Fisheries Science and Technology. 2016; 5(2): 17-26.

13. Selahvarzi Y, Tehranifar A, Jahanbakhas V. Association of antioxidant and antifungal activity of different parts of pomegranate (Punica granatum L.) with its phenolic content. Iranian Journal of Medicinal Plants and Aromatic Plants. 2011; 27(1): 47-56.

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. Journal of Applied Biology. 2016; 29(1): 143-158.

15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic acids research. 2001;29(9):2002-7.

16. 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 Medicine. 2019;26(138):9-20.

17. Berizi, E., Shekarforoush, S., Hosseinzadeh, S. Investigation of the antioxidant properties of metanolic peel extract of pomegranate (Punica granatum var. Rabbab) Journal of Food Hygiene. 2016;3(23): 13-20.

18. Bachoual R, Talmoudi W,.Boussetta T, Braut F,and El-Benna J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. Food Chem. Toxicol. 2011; 49(6): 1224 - 8.

19. Zahin, M., Aqil, F. & Ahmad, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extracts. Mutation research. 2010; 703: 99-107.

20. Modaeinama S, Abasi M, Mesgari Abbasi M, Jahanban R. Esfahlan, Anti Tumoral Properties of Punica Granatum (Pomegranate) Peel Extract on Different Human Cancer Cells.Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(14):5697-5701.

21. Dana N, Haghjooy Javanmard S, Fazilati M, Asghar Pilehvarian A. Anti-Angiogenic Effects of Pomegranate Peel Extract (Punica Granatum L.) on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Isfahan Medical School. 2012;30(195).

22. Tafrihi M, Nakhaei SR. Effect of acetone-derived pomegranate extract on the expression of E-cadherin and β-catenin proteins in PC-3 cells. Journal of Molecular and Cellular Research. 2016; 29(1): 48-58.

23. Rhode J, Fogros S, Zick S, Wahl H, Griffith K, Huang J and Liu R. Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer. BMC complementary and Alternative Medicine. 2007; 7(1):44.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2019, Volume 7, No. 3: 12-23.

Original article

Evaluation of the effect of methanolic extract of pomegranate peel on cytotoxicity induction and PDGF gene expression in cervical cancer (Hela cell line)

Sarabanou Torkaman[1], Narges Nikoonahad Lotfabadi[1*], Fatemah Haghirossadat[2]

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran

2. Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Corresponding author: nikounahad_1976@yahoo.com

Keywords:

Pomegranate peel extract,

Angiogenesis,

PDGF gene,

Anti-can

Abstract

Background & Aim: Extract of pomegranate peel is a potential bioactive substance to combat cancer due to its rich cytotoxic components including polyphenols. This study aimed to identify phytochemical ingredients of pomegranate peel extract and assessed the level of their cytotoxicity on a cervical cancer cell line. In addition, the effect of this extract on expression of a key gene in the process of angiogenesis was evaluated.

***Methods*:** In the present study, pomegranate peel ingredients were extracted qualitatively using the Soxhlet apparatus and their phytochemical composition was identified. The level of cytotoxicity of different concentrations of the extract in different time intervals was assessed on the Hela cell line using the MTT assay. Then, the PDGF gene expression in the cells treated by the extract was evaluated quantitatively employing the Real-time PCR technique. Statistical analysis was based on Duncan's multiple range test using SPSS software package and linear regression model.

***Results*:** The phytochemical tests proved that methanolic extract of the pomegranate peel contained different ingredients such as polyphenols. MTT test results revealed that the extract possesses antitumor effect at different concentrations. Gene expression studies indicated that the extract decreases the expression of PDGF in Hela cancer cell line (P=0.004).

***Conclusion*:** The pomegranate peel extract induces antitumor and cytotoxic effects and is able to inhibit the growth and spread of cervical cancer cells, thus it might have the potential to be used effectively in the prevention of cancer cell proliferation.

How to Cite this Article: Torkaman S, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirossadat F. Evaluation of the effect of methanolic extract of pomegranate peel on cytotoxicity induction and PDGF gene expression in cervical cancer (Hela cell line). Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2019;7(3):12-23.

Copyright © 2019 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.