دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان

دانشکده پزشکی

مقاله جهت اخذ درجه دکترای حرفه ای پزشکی

عنوان مقاله

بررسی اثر عصاره ی پوست انار بر روی تکثیر تومور ملانوما از طریق گیرنده های PPAR-α و PPAR-γ

شماره طرح :

۲۹۰۰۶۶

نگارش:

آذین آذرفر

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر شقایق حق جوی جوانمرد

(دانشیار دانشکده پزشکی)

دی ماه ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه:اثر ضد سرطانی میوه انار در چندین نوع سرطان بررسی شده است، ولی تاکنون مطالعه ای در رابطه با اثر ضد سرطانی عصاره پوست انار که سرشار از آنتوسیانین هاست انجام نشده است.هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره پوست انارسیاه بر روی تکثیر تومور ملانوما در موش ها و همچنین بررسی مکانیسم اثر آن است.

روش ها: عصاره هیدروالکلی پوست انار سیاه یزد تهیه گردید. پوست خشک شده انار به همراه حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد به هم زده شد. پس از صاف شدن تحت خلا، حلال آن در دمای ۶۰ درجه ی سانتی گراد تحت خلا تبخیر شد و عصاره توسط دستگاه فریز درای به پودر تبدیل شد و در دمای ۸۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. تعداد ۵۶ موش به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند. به همه ی موش ها در روز صفر مطالعه ۱×۱۰^{۶} سلول ملانوما به صورت زیر جلدی تزریق شد. گروه اول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و آب مقطر دریافت نمود. گروه های دوم تا پنجم از روز ۷ مطالعه به ترتیب دوزهای ۵۰،۱۰۰،۲۰۰،۴۰۰mg/kg/day را به صورت خوراکی دریافت نمودند.گروه ششم و هفتم دوز ۴۰۰ mg/kg/day را به همراه آنتاگونیست های گیرنده های PPAR-α (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و PPAR-γ (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. موش ها لاپاراتومی شده و تومورها، در روز ۱۶ مطالعه خارج شدند.در این تحقیق، اثر عصاره پوست انار بر مدل تومور ملانومای موش هایC۵۷BL۶ بررسی شد. اثر

عصاره هیدروالکلی پوست انار بر رشد سلول های سرطانی با ایندکس میتوتیک Ki-۶۷ در تومور محاسبه گردید و اندازه تومورها در روز ۱۶ مطالعه اندازه گیری شد.

یافته ها:عصاره پوست انار به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش حجم تومور و اندکس ۶۷-Ki گردید (p<۰/۰۰۱).همچنین حجم تومور و اندکس Ki-۶۷ در گروه هایی که آنتاگونیست به همراه عصاره دریافت کردند، بیشتر از گروه دریافت کننده عصاره به تنهایی بود(p < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری:عصاره هیدروالکلی پوست انار در کاهش تکثیر سلول های سرطان ملانوما و درمان آن اثر بالقوه ایی دارد و این تاثیر ازطریق گیرنده هایPPAR-γ وPPAR-α اعمال می شود.

واژگان کلیدی:ملانوما، عصاره پوست انار،ایندکس Ki-۶۷

Abstract

Introduction: pomegranate fruit extract (Punica granatum L.) has a potential antiproliferative effect in several types of cancers, but there have been no studies on the antiproliferative potential of pomegranate pericarp extract (PPE) in melanoma. The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of the extract of black pomegranate pericarp and also to assess its mechanism of action.

Methods: The hydroalcoholic extract of black pomegranate(from Yazd,Iran) pericarp was prepared. Dried and powdered pericarp of pomegranate was extracted at 35°C for 24 hours with ethanol 70% containing 1% acetic acid and finally filtered.The solvent was evaporated at 60°C with a rotary evaporator under vacuum and freeze dried and stored at -80°C. 1×10^6 B16F10 melanoma cells were injected to fifty six C57BL6 mice subcutaneously (s.c). On 7th day, mice were randomly divided into 7 groups (n=8). The first group was considered as the control group and received distilled water (PPE vehicle). Four groups received 50, 100, 200 and 400 mg/kg/day of standardized PPE, orally. The sixth group received PPE and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) antagonist (5mg/kg/day). The seventh group received PPE and PPAR-α antagonist (10mg/kg/day). In this study, the antiproliferative effect of hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp in the mouse model of melanoma was assessed. On 16th day, tumor size was measured and then mice were euthanized and their tumor samples were analyzed by immunohistochemistry staining for Ki-67.

Results: PPE dose dependently decreased tumor volume and proliferative marker ($P<0.001$). Moreover, tumor size and proliferative marker in the groups which received both PPAR antagonists and PPE, was more than the group which received PPE ($P<0.001$).

Conclusion: Taken together, our observations suggest that hydroalcoholic PPE may have potential implication in melanoma cancer treatment and antiproliferative effect of PPE may be mediated through PPAR-α and PPAR-γ receptors.

Keywords: Pomegranate pericarp extract, melanoma, Ki-67 index

REFERENCES:

1. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. The oncologist 2011; 16(1):5-24. PubMed PMID: 21212434. Pubmed Central PMCID: 3228046.

2. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annual review of medicine 2002; 53:409-35. PubMed PMID: 11818483.

3. Yasui Y, Kim M, Tanaka T. PPAR Ligands for Cancer Chemoprevention. PPAR research 2008; 2008:1-10.

4. Eastham LL, Mills CN, Niles RM. PPARalpha/gamma expression and activity in mouse and human melanocytes and melanoma cells. Pharmaceutical research 2008; 25(6):1327-33. PubMed PMID: 18172578.

5. Freudlsperger C, Schumacher U, Reinert S, Hoffmann J .The Critical Role of PPARgamma in Human Malignant Melanoma. PPAR research 2008; 2008:503797:1-5. PubMed PMID: 18483619. Pubmed Central PMCID: 2377344.

6. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. Eur J Cancer 2001; 37(8):948-65.

7. Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013:789764:1-18.

8. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, Mansel RE, Neeman I, Geldof AA, Campbell MJ. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food 2004; 7(3):274-83.

9. 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.

10. Yunfeng Li, Changjiang Guo, Jijun Yang, Jingyu Wei, Jing Xu, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. food chemistry 2006; 96(2):254-60.

11. Ni Q, Xu G, Lu G, Gao Q, Zhou C, Zhang Y. Investigation of the stability and antioxidant properties of anthocyanins-based purple potato colorants after processing. African Journal of Biotechnology 2012; 11(14):3379-3387.

12. Oancea S, Drăghici O. PH and Thermal Stability of Anthocyanin-based Optimised
Extracts of Romanian Red Onion Cultivars. Czech Journal of Food Science 2013; 31(3):283-291.

13. Downer EJ, Clifford E, Amu S, Fallon PG, Moynagh PN. The synthetic cannabinoid R(+)WIN55,212-2 augments interferon-beta expression via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. The Journal of biological chemistry 2012; 287(30):25440-53. PubMed PMID: 22654113. Pubmed Central PMCID: 3408184.

14. Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahashi H, Ikeda I, et al. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. Cancer science 2008; 99(10):1892-900. PubMed PMID: 19016747.

۱۵. دانا نسیم، حق جوی جوانمرد شقایق، فضیلتی محمد، پیله وریان علی اصغر.اثر آنتی آنژیوژنیک عصاره ی پوست انار سیاه بر سلو لهای اندوتلیال بند ناف انسان . مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱.سال سی ام،شماره ۱۹۵: ۹۲۱-۹۱۳.

16. Giaginis C, Kakoulidou AT, Theocharis S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Ligands: Potential Pharmacological

Agents for Targeting the Angiogenesis Signaling Cascade in Cancer. PPAR research 2008; 2008:1-12.
17. Li Y, Qi Y, Huang T, Yamahara J, Roufogalis B. Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR alpha/gamma activator properties. Diabetes Obes Metab 2008; 10(1):10-7.

18. Hontecillas R, O'Shea M, Einerhand A, Diguardo M, Bassaganya-Riera J. Activation of PPAR gamma and alpha by Punicic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity-related inflammation. Journal of the American College of Nutrition 2009; 28(2):184-95.

19. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. Atherosclerosis 2007; 195(2):313-21.

20. Maira F, Catania A, Candido S, Russo AE, McCubrey JA, Libra M, et al. Molecular targeted therapy in melanoma: a way to reverse resistance to conventional drugs. Current drug delivery 2012; 9(1):17-29. PubMed PMID: 22023213.

21. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. The Journal of nutritional biochemistry 2005; 16(6):360-7. PubMed PMID: 15936648.

22. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Investigational new drugs 2005; 23(1):11-20. PubMed PMID: 15528976.