Original Article

Investigating the synergistic effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and quercetin on Calu-6 human lung carcinoma cells

Osmani Sh, Mohseni-Kouchesfahani H*, Jalali H

Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2019/06/22 | Accepted: 2019/11/3

Abstract:

Background: Lung cancer is one of the most common cancers. Herbal compounds have been considered for the treatment of cancer due to anticancer effects. Peel of Pomegranate (*Punica granatum* L.) has antioxidant and anticancer properties due to its phenolic compounds. Quercetin is a herbal flavonoid that can inhibit the proliferation of cancer cells. The present study compared the anti-proliferative effects of pomegranate's fruit peel extract and quercetin on the calu-6 human lung carcinoma cell line and their co-effects in inhibiting the proliferation and migration of cancer cells.

Material and Methods: Calu-6 cell line was purchased from Pasteur institute and cultured in RPMI1640 medium containing 10% FBS and 1% antibiotic. To determine the survival rate of t-cells, MTT assay was performed. Type of cell death was determined by flow cytometry, and scratch test was used to determine the migration rate of the cells.

Results: The results showed that pomegranate fruit peel extract and quercetin inhibited the proliferation of lung cancer cells. Also, quercetin and pomegranate extract induced apoptosis in calu-6 cells individually and simultaneously so that the level of expression of annexin-V in quercetin and pomegranate peel extract was 18.20% and 15.59%, respectively, and increased by 25.51% during the co-treatment that difference was significant at $P<0.05$ The results of the scratch test also indicated that pomegranate peel extract and quercetin inhibited metastatic activity in calu-6 cells.

Conclusion: The results of this study showed that quercetin and pomegranate peel extract have anti-cancer effects and can be considered as a complementary medicine of lung cancer.

Keywords: Lung cancer, Quercetin, Pomegranate peel extract, Proliferation, Migration

***Corresponding Author:**
Email: kouchesfehani@yahoo.com
Tel: 0098 912 384 4874
Fax: 0098 218 607 2709

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2020; Vol. 23, No 6, Pages 596-604

Please cite this article as: Osmani Sh, Mohseni-Kouchesfahani H, Jalali H. Investigating the synergistic effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and quercetin on Calu-6 human lung carcinoma cells. ***Feyz*** 2020; 23(6): 596-604.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

بررسی اثر هم‌افزایی عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار (*Punica granatum* L.) و کوئرستین بر رده‌ی سلولی Calu-6 متعلق به سرطان ریه سلول غیرکوچک

شیما عثمانی [۱]، هما محسنی کوچصفهانی [۲*]، هانیه جلالی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان ریه یکی از شایع‌ترین سرطان‌هاست. ترکیبات گیاهی به‌دلیل اثرات ضدّسرطانی، در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. پوست انار (*Punica granatum* L.) به‌دلیل داشتن ترکیبات فنولی، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدّسرطانی است. کوئرستین یک فلاونوئید گیاهی است که قادر به مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌باشد. در پژوهش حاضر اثرات ضدّتکثیری عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار و کوئرستین در رده‌ی سلولی کارسینومای ریه‌ی انسانی calu-6 مقایسه شد و اثر هم‌افزایی آن‌ها در مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: رده‌ی سلولی Calu-6 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک کشت شد. جهت تعیین درصد بقای سلول‌ها، تست MTT انجام شد. نوع مرگ سلولی توسط روش فلوسایتومتری تعیین و جهت تشخیص میزان مهاجرت سلولی از تست خراش استفاده شد.

نتایج: عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار و کوئرستین موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطان ریه شدند؛ همچنین، کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار به‌صورت جداگانه و همزمان موجب القای آپوپتوز در سلول‌های calu-6 شدند، به‌طوری‌که میزان بیان Annexin-V در تیمار کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار به ترتیب ۱۸/۲۰ و ۱۵/۵۹ درصد بود و در طی تیمار همزمان به ۲۵/۵۱ درصد افزایش یافت که این اختلاف در سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار بود. نتایج حاصل از تست خراش نیز نشان داد که عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار و کوئرستین موجب مهار متاستاز در سلول‌های calu-6 شدند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد کوئرستین و عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار دارای اثرات ضدّسرطانی هستند و می‌توانند در مکمل درمانی سرطان ریه مورد توجه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سرطان ریه، کوئرستین، عصاره‌ی انار، تکثیر، مهاجرت

دو ماه‌نامه علمی – پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۸، صفحات ۶۰۴-۵۹۶

مقدمه

براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، سرطان ریه اوّلین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است. مصرف سیگار، آلودگی هوا، مواد صنعتی و سابقه‌ی فامیلی به‌عنوان عوامل خطر در ایجاد سرطان ریه در یک فرد محسوب می‌شوند [۱]. سرطان ریه سلول غیرکوچک (Non-small-cell lung carcinoma: NSCLC) شایع‌ترین نوع سرطان ریه است که ۸۵ درصد از کلّ سرطان ریه را به خود اختصاص داده است [۲]. مطالعات نشان داده که ۳۵ درصد از سرطان‌ها می‌توانند با تغییر در رژیم غذایی مهار شوند [۳]؛ میوه‌ها و سبزیجات منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که به‌عنوان عوامل حفاظتی در مقابل انواع مختلف سرطان‌ها نقش ایفا می‌کنند [۴]. آنتی‌اکسیدان‌ها دارای فعالیت ضدّسرطانی بوده، نقش مؤثر آن‌ها در برابر سرطان‌های ریه، پستان، روده و پروستات گزارش شده است [۵]. مواد گیاهی که دارای حجم بالاتری از ترکیبات فنولی هستند دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتری نیز هستند؛ زیرا قادر به جایگزینی گروه هیدروکسیل در حلقه‌های آروماتیکی ترکیبات فنلی هستند [۶]. پلی‌فنول‌ها موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، مهار تکثیر سلول‌های جهش‌یافته و کاهش تولید سیکلواکسیژناز ۲ و همچنین کاهش بیان ژن‌های سرطانی می‌شوند [۷]. انار با نام علمی (*Punica granatum* L.) بومی ایران بوده، در طب سنتی اغلب برای درمان مشکلات گوارشی، چربی خون، عفونت‌های باکتریایی و قارچی و مشکلات باروری مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹،۸]. به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی و همچنین تانن‌های هیدرولیز شده که در بخش‌های مختلف انار نظیر دانه و پوست یافت می‌شود، این گیاه امروزه در درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی – عروقی مورد توجه می‌باشد [۱۰]. مطالعات

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی - تکوینی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۴۸۷۴ **دورنویس:** ۰۲۱۸۶۰۷۲۷۰۹

پست الکترونیک: kouchesfehani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۸/۱۲

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

مختلف نشان داده که روغن دانه‌ی انار و عصاره‌ی پوست آن دارای اثر ضدّسرطانی بوده، موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، توقف چرخه‌ی سلولی و همچنین مهار رگ‌زایی در تومورها می‌شوند [۱۱]. آنالیز HPLC (کروماتوگرافی مایع با انرژی بالا) نشان داده که پوست میوه‌ی انار سرشار از تانن‌های قابل هیدرولیز به‌طور عمده الاژیک اسید، پونیکالین، پدونکولاجین و پونیکالاجین است [۱۲]. الاژیک اسید و پونیکالاجین از رشد سلول‌های سرطانی از طریق القای آپوپتوز جلوگیری می‌کند که از طریق برخی از مسیرهای اساسی مثل معرفی سیتوکروم در سیتوزول، تنظیم Bax و مدولاسیون روبه پایین خانواده Bcl-2 صورت می‌گیرد [۱۳]. کوئرستین (3,3′,4′,5,7-pentahydroxy-flavone) یکی از فلاونوئیدهایی است که به میزان بالا در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده که این ماده دارای اثرات ضدّسرطان و ضدّالتهابی است. بسته به نوع سلول و نوع تومور، کوئرستین می‌تواند چرخه‌ی سلولی را در گذر از فاز G2/M و یا در G1/S بلوکه کند. در رده‌های سلولی کارسینومای پستان انسانی کوئرستین تکثیر سلول‌ها را متوقف می‌کند و بیان سایکلین B1 و کینازهای وابسته به سایکلین ۱ که برای پیشرفت فاز G2/M چرخه‌ی سلولی ضروری می‌باشد، کاهش می‌دهد [۱۴]. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و پروآپوپتوتیک عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین و کاربرد هر دوی این مواد در طب سنتی و مکمل، در پژوهش حاضر اثرات مهارکنندگی آن‌ها در رده‌ی سلولی Calu-6 متعلق به سرطان ریه سلول غیرکوچک به‌صورت جداگانه و به‌صورت هم‌افزایی بررسی شد. در اغلب مطالعات از غلظت‌های بالای کوئرستین و بازه‌ی غلظتی ۲۵ µM الی ۲۰۰ µM جهت مهار سلول‌های سرطانی استفاده شده است؛ اما بررسی‌ها نشان داده که بالاترین غلظت کوئرستین در خون پس از مصرف غذایی این ماده ۱۰ µM است [۱۴] و در نتیجه در مطالعه‌ی حاضر این غلظت از کوئرستین مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی با کد اخلاق ۸۵۰۴ صورت گرفت.

کشت سلول

رده‌ی سلولی Calu-6 متعلق به سرطان ریه سلول غیرکوچک از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen, UK) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Gibco-Invitrogen, UK) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Gibco-Invitrogen, UK) در فشار CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. محیط کشت سلولی هر ۴۸ ساعت تعویض شد.

تهیه‌ی عصاره‌ی پوست میوه‌ی انار

میوه‌ی انار از منطقه‌ی اورامانات سنندج ایران جمع‌آوری شد. عصاره‌ی متانولی با استفاده از روش سوکسیله استخراج شد. سوکسیله یکی از ابزارهای آزمایشگاهی است که توسط شیمی‌دان آلمانی فرانس فون سوکسیله (Franz von Soxhlet) در سال ۱۸۹۷ میلادی اختراع شد. مزیت این روش استفاده از مقدار معینی حلال برای جداسازی عصاره موردنظر است. عصاره‌ی آماده‌شده در دمای ۴°C نگهداری شد و پس از رقیق‌سازی توسط فیلتر سرسرنگی استریل و جهت تیمار سلولی استفاده شد.

تهیه‌ی محلول کوئرستین

کوئرستین به‌صورت پودری زردرنگ از شرکت Sigma-Aldrich-UK خریداری شد و در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO, Sigma, UK) حل و در شرایط تاریکی و دور از نور در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تست MTT

پودر MTT (3, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) از شرکت Sigma-Aldrich-UK خریداری شد و جهت تهیه‌ی محلول ۵mg از آن در ۱ml محلول PBS حل شد. جهت انجام تست MTT، ۲×۱۰^{۴} سلول در پلیت‌های ۲۴ خانه برای تیمار با کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار، کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، دوزهای مختلف کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار به خانه‌های مربوط به تست اضافه شد و به مدت‌زمان تعیین‌شده انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول (۵ mg/ml) MTT در شرایط تاریکی اضافه شد. سپس به‌مدت چهار ساعت در تاریکی و در انکوباتور قرار گرفت که در این مدت کریستال‌های فورمازان تشکیل شد. کریستال‌ها با اضافه شدن ۱ میلی‌لیتر حلال DMSO به حالت محلول درآمدند و به کوت‌های مخصوص اسپکتروفوتومتری انتقال یافتند. در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و درصد بقای سلول‌ها از تقسیم جذب نوری خوانده‌شده برای گروه تست بر جذب نوری خوانده‌شده برای گروه کنترل به‌دست آمد [۱۵].

تست Annexin V-FITC توسط فلوسایتومتری

برای انجام روش فلوسایتومتری از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC (Abcam-ab14085, USA) استفاده شد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

سلول‌ها در فلاسک‌های $25cm^2$ به تعداد 4×10^5 کشت داده شدند. پس از طی ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های ۱ µM کوئرستین، ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست انار و همچنین هر دو به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از اتمام ۴۸ ساعت برای انجام فلوسایتومتری جمع‌آوری شدند؛ بدین‌صورت که پس از تریپسینه کردن، سلول‌ها یک‌بار با محیط کشت کامل شست‌وشو داده شده، پس از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه طبق دستورالعمل موجود در کیت سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر از بایندینگ بافر معلق شدند. پس از آن ۵µl Annexin V-FITC و ۵ µl پروپیدیوم یدید به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون میزان بیان انکسین V توسط دستگاه فلوسایتومتری BD FACS caliber خوانده شد [۱۶].

تست ترمیم خراش

تست ترمیم خراش یکی از تکنیک‌های اوّلیه در بررسی مهاجرت و تقابل سلول‌ها با یکدیگر در عدم حضور یک جذب‌کننده شیمیایی می‌باشد. برای روش تست ترمیم خراش به‌صورت زیر عمل می‌شد: ابتدا ۴۰۰/۰۰۰ سلول در هر چاهک یک پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد و زمانی‌که سلول‌ها ۹۰ درصد سطح هر چاهک را به‌صورت یک لایه‌ی سلولی پوشاندند، کف پلیت توسط سر سمپلر خراش داده شد و سلول‌های خراش داده شده توسط تعویض محیط حذف شدند. پس از ایجاد خراش سلول‌ها با غلظت‌های خاصّی از کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار و یا هر دو به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از اتمام زمان تیمار جهت مقایسه از سطح خراش داده شده عکسبرداری شد [۱۷].

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند و جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Instat 3 و از روش one-way ANOVA استفاده شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

اثر عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین بر تکثیر و بقای سلول‌های Calu-6

سلول‌های Calu-6 با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پوست انار (۱µg/ml، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱mg/ml) به مدت ۴۸ ساعت تیمار و انکوبه شدند. میزان بقای سلولی بعد از این مدت زمان با استفاده از روش رنگ‌آمیزی MTT، تعیین شد. نتایج نشان داد که عصاره‌ی پوست انار دارای اثر وابسته به دوز است به این معنی که هرچه غلظت افزایش پیدا می‌کند، درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد (شکل ۱A). غلظت ۵ درصد کشندگی یا IC_{50} برای تیمار ۴۸ ساعت عصاره‌ی پوست انار ۲۵۰ µg/ml به‌دست آمد. تیمار سلول‌های Calu-6 با غلظت‌های مختلف کوئرستین (۱۰ µM، ۵، ۵/۲، ۱) به مدت ۴۸ ساعت نشان داد که کوئرستین دارای اثر وابسته به دوز است و هرچه غلظت افزایش پیدا می‌کند درصد بقای سلولی کاهش می‌یابد (شکل ۱B) IC_{50} برای تیمار ۴۸ ساعت کوئرستین ۹۰/۱ µM به‌دست آمد. پس از تعیین دوزهای کشنده و IC_{50} هر دو ماده، اثر هم‌افزایی عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین بر سلول‌های Calu-6 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از MTT نشان داد که درصد بقای سلولی پس از تیمار با غلظت‌های ۱ µM کوئرستین و ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست انار نسبت به تیمار سلول‌ها با این مواد به‌صورت جداگانه کاهش معنی‌داری یافت (شکل **1C**)؛ به‌عبارت دیگر کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار اثرات کشندگی همدیگر را تقویت نموده، در غلظت‌هایی کمتر از IC_{50} تعداد بیشتری از سلول‌های سرطانی Calu-6 را از بین بردند.

تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های Calu-6 تیمارشده با عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌هایی که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند دارای ظاهری طبیعی و غشای سلولی سالم بودند (شکل ۲A) اما در حضور غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست انار سلول‌ها ظاهری چروکیده به خود گرفته، سپس شروع به قطعه‌قطعه شدن کردند که پیامد آن حضور اجسام آپوپتوزی در محیط کشت بود (شکل ۲B). همچنین تیمار سلول‌ها با غلظت ۱ µM از کوئرستین نیز منجر به مشاهده‌ی چنین علائمی که از ویژگی‌های مرگ سلولی است، شد (شکل ۲C). تیمار همزمان سلول‌ها با این دو ماده منجر به افزایش میزان مرگ سلولی شد که نشان‌دهنده‌ی اثر هم‌افزایی عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین بود (شکل ۲D).

القای آپوپتوز در سلول‌های Calu-6 تیمارشده با عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین

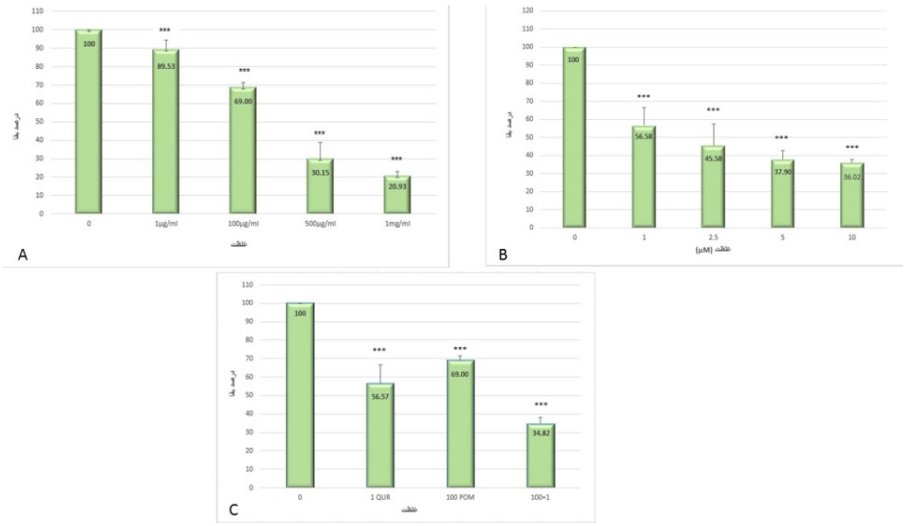
جهت تعیین نوع مرگ سلولی تست Annexin-PI انجام شد. پس از کشت و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱ µM کوئرستین، ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست انار و همچنین هر دو ماده، میزان بیان انکسین و پروپیدیم یدید اندازه‌گیری شد. در نتایج آنالیزهای فلوسایتومتری میزان آپوپتوز در گروه تیمارشده با غلظت ۱ µM کوئرستین ۱۸/۲۰ درصد بود. میزان آپوپتوز در غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست انار ۱۵/۵۹ بود و در زمان کشت همزمان ۱µM کوئرستین به همراه ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پوست

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

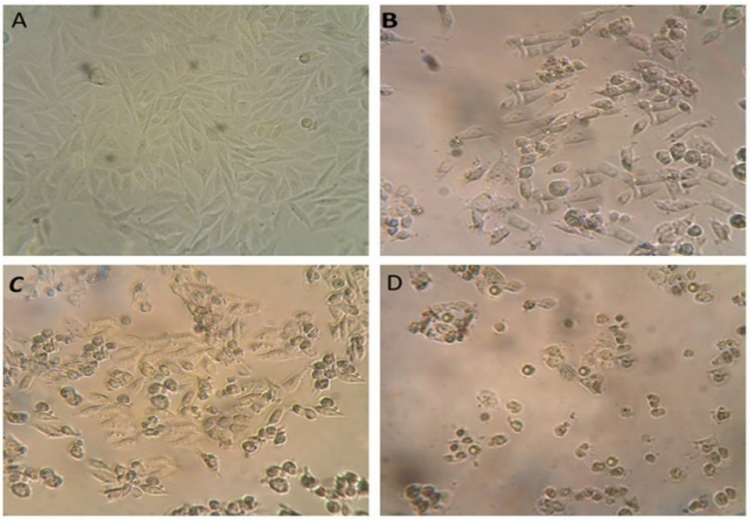
انار میزان آپوپتوز ۲۵/۵۱ درصد بود. این نتایج نشان می‌دهند که تیمار همزمان سلول‌های calu-6 توسط کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار مرگ آپوپتوز را بیشتر از تیمار با هر ماده به‌صورت جداگانه القا می‌نماید (جدول شماره ۱ و شکل شماره ۳).

مهار مهاجرت سلولی در سلول‌های Calu-6 تیمارشده با عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین

پس از این‌که سلول‌ها با غلظت‌های ۱ µM کوئرستین و ۱۰۰µg/ml عصاره‌ی پوست انار و هر دو با هم تیمار شدند، مهاجرت سلولی در آن‌ها طی مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید. سلول‌ها در حضور ماده‌ی تیماری مهاجرت کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند؛ زیرا ناحیه‌ی خراش داده‌شده در گروه کنترل پر شد ولی در گروه‌های تیمارشده به‌علت مهار مهاجرت سلول‌ها، ناحیه‌ی خراش به‌طور کامل ترمیم نشد (شکل شماره ۴).

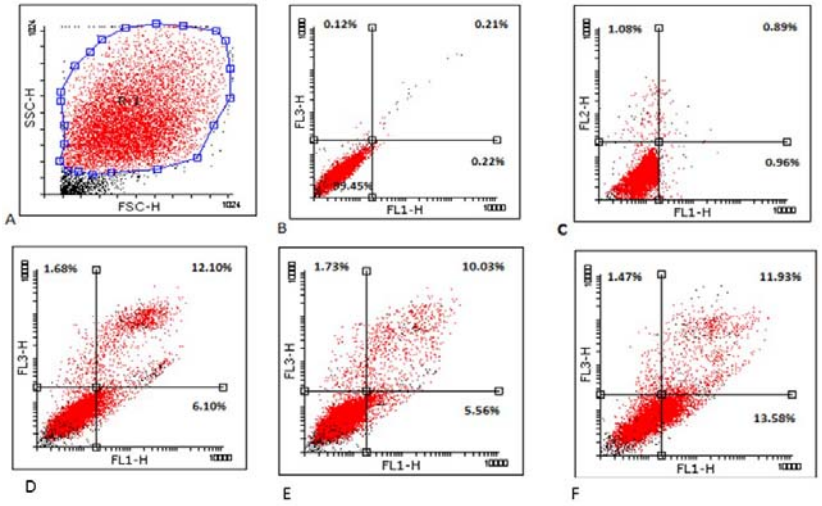


شکل شماره ۱- درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT پس از تیمار در زمان ۴۸ ساعت. A- تیمار با عصاره‌ی پوست انار، B- تیمار با کوئرستین، C- تیمار با هر دو ماده‌ی عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین ($n=3$, Mean±S.D), ***P<۰/۰۰۱.

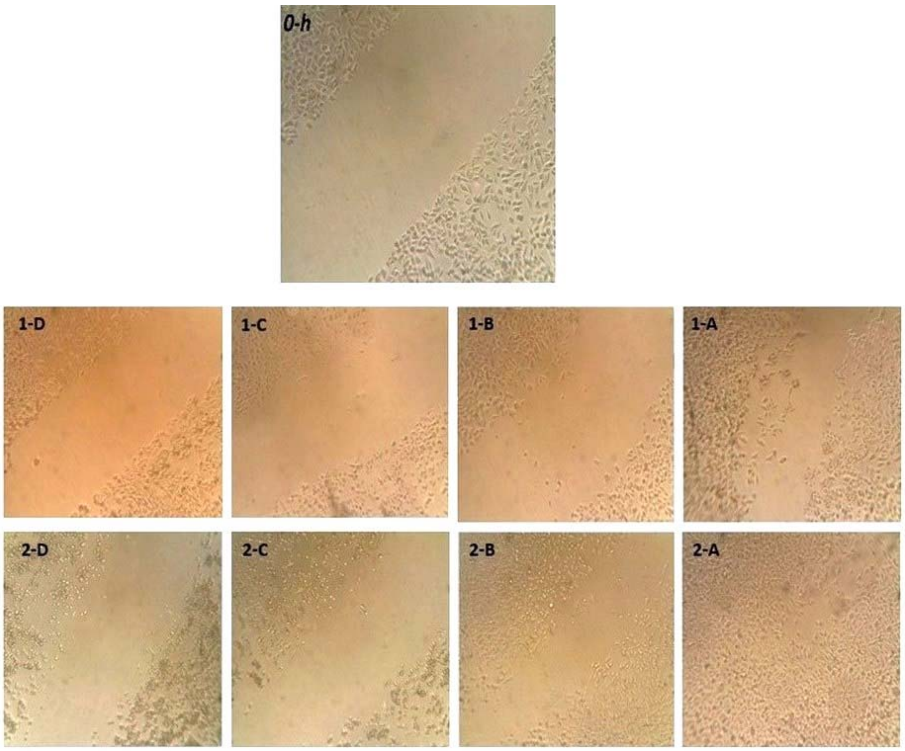


شکل شماره ۲- مشاهدات مورفولوژیکی سلول‌های calu-6، حروف‌های A, B, C و D به ترتیب نشان‌دهنده‌ی گروه کنترل، سلول‌های تیمارشده با عصاره‌ی پوست انار، سلول‌های تیمارشده با کوئرستین، سلول‌های تیمارشده با هر دو (مشاهده با میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰×)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]



شکل شماره ۳- مقایسه‌ی بیان انکسین و پروپیدیم یدید در نمونه‌های تیمارشده و نشده با کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار با استفاده از روش فلوسایتومتری. در هرکدام از نمودارها آن دسته از سلول‌هایی که در بخش پایین – چپ قرار دارند، سلول‌های کامل سالم را نشان می‌دهند. سلول‌های بخش بالا – چپ سلول‌های دچار نکروز، بخش بالا راست سلول‌های مرحله Late Apoptosis و بخش پایین راست سلول‌هایی را که در مرحله‌ی Early Apoptosis قرار دارند، را نشان می‌دهند. شکل (A) برای تنظیم دستگاه، (B) گروه رنگ‌نشده، (C) گروه تیمارنشده، (D) گروه تیمارشده با ۱μM کوئرستین، (E) گروه تیمارشده با ۱۰۰μg/ml عصاره‌ی پوست انار، (F) گروه تیمارشده با کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار به‌طور همزمان.



شکل شماره ۴- بررسی مهاجرت سلول‌های calu-6 تیمارشده با کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار و هر دو ماده طی مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت. شکل h-۰ نشان‌دهنده‌ی محدوده‌ی خراش‌یافته در ساعت صفر، ردیف‌های ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت و حروف D,C,B,A به ترتیب نشان‌دهنده‌ی گروه کنترل، سلول‌های تیمارشده با ۱μM کوئرستین، سلول‌های تیمارشده با ۱۰۰μg/ml عصاره‌ی پوست انار و سلول‌های تیمارشده با هر دو ماده هستند. پیکان‌ها نشان‌دهنده‌ی ناحیه‌ی عاری از سلول هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است در گروه A که فاقد هر نوع تیماری بوده این محدوده کاملاً توسط سلول‌ها پر شده است در حالی‌که در بقیه‌ی گروه‌ها به‌دلیل مهار مهاجرت سلولی ناحیه‌ی خراش‌یافته به‌طور کامل ترمیم نشده است. (مشاهده با میکروسکوپ نوری معکوس با بزرگنمایی۴۰×). فلش‌های تیره نشان‌دهنده‌ی محدوده‌ی خراش هستند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

جدول شماره ۱- تعیین درصد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های تحت تیمار با کوئرستین، عصاره‌ی پوست انار و هر دو، توسط رنگ‌آمیزی Annexin-PI و روش فلوسایتومتری.

گروه	درصد آپوپتوز	درصد نکروز
کنترل	۱/۸۵	۱/۸۰
تیمار با ۱μM کوئرستین	۱۸/۲	۱/۶۸
تیمار با ۱۰۰μg/ml عصاره‌ی پوست انار	۱۵/۵۹	۱/۷۳
تیمار همزمان	۲۵/۵۱	۱/۴۷

بحث

در مطالعه‌ی حاضر برای اوّلین‌بار اثر هم‌افزایی کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های مربوط به سرطان ریه سلول غیرکوچک بررسی شد؛ نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار هر دو دارای اثر ضدّتکثیری و ضدّمهاجرتی در این رده‌ی سلولی هستند و می‌توانند با القای مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده موجب مرگ این رده‌ی سرطانی شوند. همچنین بررسی اثر هم‌افزایی این دو نشان داد که استفاده‌ی همزمان این دو ترکیب در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت ۵۰ درصد کشندگی دارای اثر ضدّسرطانی بیشتری از اثر جداگانه و واحد هر ماده بود؛ به‌عبارتی استفاده‌ی هم‌زمان از غلظت‌های پایین‌تر این دو ماده می‌تواند موجب پاسخ درمانی بیشتری گردد. Song و همکارانش در سال ۲۰۱۶ اثر عصاره‌ی پوست انار بر سلول‌های HepG2 را بررسی کردند. یافته‌ی آن‌ها نشان داد که عصاره‌ی پوست انار با افزایش بیان کاسپاز-۳ و نسبت Bax/Bcl2 و همچنین افزایش میزان پروتئین p53 موجب القای آپوپتوز در این سلول‌های متعلق به سرطان کبد می‌شود [۱۸]. Asmaa و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی فعالیت ضدّسرطانی عصاره‌ی پوست انار بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطان خون میلوئیدی حاد (AML) رده‌ی سلولی K562 پرداختند. آنالیزهای فیتوشیمیایی آنان وجود مقادیر بالایی از تانن‌ها و ترکیبات فنولی و مقادیر متوسطی از ساپونین‌ها و فلاونوئیدها را اثبات کرد و همچنین نشان داد که عصاره‌ی پوست انار اثر مهاری وابسته به دوز بر رشد و تکثیر رده‌ی سلولی K562 دارد. همچنین در مطالعه‌ی آن‌ها مکانیسم اثر عصاره‌ی پوست انار بر القای آپوپتوز نیز مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که در سلول‌های تیمارشده با عصاره‌ی پوست انار افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوزی مانند سیتوکروم C، کاسپاز ۳، ۷ و ۹، P53، P21 و AKT همراه با کاهش بیان Bcl-2 صورت می‌گیرد [۱۹]. در مطالعه‌ی Dikman و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی پوست انار و ارتباط آن با قابلیت ضدّتکثیری و اثرات آپوپتوتیک در رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی شد. آنالیز HPLC (کروماتوگرافی مایع با انرژی بالا) نشان داد بیشترین فنولیک اسید موجود در عصاره‌ی پوست انار الاژیک اسید و گالیک اسید می‌باشد [۲۰] که یک مهارکننده‌ی قوی برای درمان سرطان است [۱۰]. Dana و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار سیاه بر تکثیر سلول‌های ملانوم B16F10 و رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVECs) پرداختند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی پوست انار درصد بقای سلولی را در سلول‌های HUVECS، ۱۷-۶ درصد کاهش می‌دهد و اثر عصاره‌ی پوست انار بر رده‌ی سلولی B16F10 به‌صورت وابسته به دوز بوده، میزان سمیت آن از ۱ درصد تا ۶۱ در غلظت‌های μg/ml ۴۵۰-۱۰ می‌باشد [۲۱]. در مطالعه‌ی حاضر نیز نتایج حاصل در تطابق با نتایج دیگر محققان نشان داد که عصاره‌ی متانولی پوست انار در اثری وابسته به غلظت باعث القای مرگ آپوپتوز در سلول‌های Calu-6 می‌شود. نتایج حال از تست Annexin-VI برای اوّلین‌بار نشان داد که عصاره‌ی پوست انار در سلول‌های سرطان ریه سلول غیرکوچک، موجب القای آپوپتوز می‌گردد که با توجه به مکانیسم‌های شناخته‌شده در خصوص ترکیبات موجود در عصاره‌ی پوست انار و به‌خصوص آلاژیک اسید، چنین اثر ضدّسرطانی عصاره‌ی پوست انار عمدتاً ناشی از فعال‌شدن کاسپاز ۳ و افزایش نسبت Bax/Bcl2 می‌باشد [۲۲]. Lee و همکارانش در سال ۲۰۱۵، اثر کوئرستین و یک نوع داروی شیمی‌درمانی به نام جمسیتابین را بر روی رده‌های سلولی A549 متعلق به آدنوکارسینوما اپلتلیال آلوئورلار ریه مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در درصد بقای سلولی در غلظت μM ۱۰، ۲۰ درصد کاهش پیدا کرده و در غلظت μM ۲۰۰ در رده‌ی سلولی A549، ۶۰ درصد کاهش پیدا کرده که نشان‌دهنده‌ی اثر وابسته به دوز کوئرستین می‌باشد [۲۳]. Shan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که کوئرستین به‌طور قابل توجهی تکثیر سلولی را در رده‌های سلولی SW480 و Clone 26 سرطان کولون به‌صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان مهار می‌کند [۲۴]. Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای در مورد اثر کوئرستین بر رده‌ی سلولی PC-3 سرطان پروستات انجام و نشان دادند که سلول‌های تیمارشده با کوئرستین در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت را با غلظت‌های مختلف بقای سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز کاهش داده، موجب آپوپتوز و همچنین کاهش پروتئین ضدّآپوپتوزی Bcl-2، افزایش پروتئین پروآپوپتوزی Bax و فعال‌شدن کاسپاز ۳، ۹ و ۸ می‌شود [۲۵]. کوئرستین یک تقویت‌کننده‌ی قوی آپوپتوز با

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

واسطه‌ی TRAIL (لیگاند القاکننده‌ی آپوپتوز با واسطه‌ی TNF) و از طریق القای بیان گیرنده مرگ ۵ (DR-5) می‌باشد. تنظیم بالای DR-5 همراه با تنظیم روبه پایین C-FLIP (که یک مهارکننده‌ی کاسپاز ۸ می‌باشد) باعث القای آپوپتوز با واسطه‌ی TRAIL می‌شود. علاوه بر این افزایش آپوپتوز با واسطه‌ی TRAIL توسط کوئرستین همچنین از طریق مهار بیان Survivine در مسیرهای سیگنالینگ ERK-MSK1 رخ می‌دهد [۲۷،۲۶]. نتایج تحقیق ما نیز نشان داد که کوئرستین در یک رده‌ی سلولی متعلق به سرطان ریه سلول غیرکوچک دارای اثر وابسته به دوز مستقیم بوده، با افزایش دوز کوئرستین درصد بقای سلول‌ها به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد. مهاجرت سلولی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و پاتولوژیکی شامل ترمیم زخم، عقب‌ماندگی ذهنی، متاستاز تومور، ایجاد آترواسکلروز و آرتریت نقش ایفا می‌کند [۲۸]. زمانی‌که سلول‌های سرطانی از تومور اوّلیه به محل‌های جدید مهاجرت می‌کنند در این محل‌ها، تومورهای ثانویه تشکیل می‌دهند که این فرآیند را متاستاز می‌گویند [۲۹]. Lai و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر کوئرستین بر مهاجرت سلول‌های SAS (سلول‌های سرطانی دهانی) پرداختند و نتایج تست خراش نشان داد که کوئرستین موجب مهار مهاجرت سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود که اثر مهاری کوئرستین بر مهاجرت از طریق مهار MMP-2 (متالوپروتئیناز ماتریکس)، MMP-9، کاهش VEGF (فاکتور رشد اندوتلیال رگی)، بلوکه‌کردن مسیرهای MAPK و PI3K صورت می‌گیرد [۳۰]. باقری و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۸ با بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار بر متاستاز و مهاجرت سلول‌های MDA-MB- 231 سرطان پستان نشان دادند که عصاره‌ی پوست انار با کاهش بیان بتا – کاتنین می‌تواند موجب مهار تغییر اپیتلیال به مزانشیم شده، از طریق چنین مکانیسمی موجب مهار متاستاز در این نوع از سرطان شود [۳۱]. همچنین کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ (MMP2/9) و افزایش بیان مهارکننده‌ی بافتی متالوپروتئینازها ۲ (TIM2) نیز از جمله مکانیسم‌هایی است که به‌واسطه‌ی آن عصاره‌ی پوست انار موجب مهار مهاجرت سلولی و متاستاز می‌شود [۲۲]. در تحقیق حاضر نیز با استفاده از تست ترمیم خراش مشاهده شد کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار به‌صورت جداگانه و همزمان موجب کاهش مهاجرت سلول‌های calu-6 شد که تأییدی بر یافته‌های پیشین بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش برای اوّلین‌بار نشان داد که کوئرستین و عصاره‌ی پوست انار دارای اثر هم‌افزایی ضدّتکثیری و ضدّمتاستازی در سلول‌های متعلق به سرطان ریه سلول غیرکوچک هستند و استفاده‌ی همزمان از این دو ماده می‌تواند موجب پاسخ‌های قوی‌تر در حضور غلظت‌های پایین‌تر شود. اثر ضدّتکثیری عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین به‌طور عمده از طریق القای مسیر آپوپتوز و همچنین مهار تکثیر و مهاجرت این سلول‌های سرطانی می‌باشد. این نتایج می‌تواند در استفاده‌ی درمانی عصاره‌ی پوست انار و کوئرستین مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی صورت گرفته است که بدین‌وسیله از حمایت‌های ایشان سپاسگزاری می‌نماییم.

Reverences:

[1] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(3): 288-300.
[2] Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. ***Mayo Clin Proc*** 2008; 83(3): 355-67.
[3] Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. ***Proc Nutr Soc.*** 2005; 64(4): 527-42.
[4] Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. ***Br J Nutr.*** 2015; 113 Suppl 2: S102-110.
[5] Sak K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. ***Nutr Cancer.*** 2014; 66(2): 177-93.
[6] Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. ***J Agric Food Chem.*** 2002; 50(25): 7449-54.
[7] Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, et al. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. ***Front Physiol.*** 2018; 9: 477.
[8] 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.
[9] Fedder MD, Jakobsen HB, Giversen I, Christensen LP, Parner ET, Fedder J. An extract of pomegranate fruit and galangal rhizome increases the numbers of motile sperm: a prospective, randomised, controlled, double-blinded trial. ***PLoS One.*** 2014; 9(9): e108532.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]

[10] Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. ***Molecules*** 2017; 22(1).
[11] 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 .
[12] Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. ***J Ethnopharmacol.*** 2012; 143(2): 397-405.
[13] 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. ***J Nutr Biochem*** 2005; 16(6): 360-7.
[14] Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. ***J Cell Biochem.*** 2009; 106(1): 73-82.
[15] Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. ***Toxicol Lett*** 2006; 160(2): 171-7.
[16] Wallberg F, Tenev T, Meier P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. ***Cold Spring Harb Protoc.*** 2016; 2016(4): pdb prot087387.
[17] Bobadilla AVP, Arevalo J, Sarro E, Byrne H M, Maini PK, Carraro T, et al. In vitro cell migration quantification method for scratch assays. ***J R Soc Interface.*** 2019; 16(151): 20180709.
[18] Song B, Li J, Li J. Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. ***Food Chem Toxicol*** 2016; 93: 158-66.
[19] Asmaa MJ, Ali AJ, Farid JM, Azman S. Growth inhibitory effects of crude pomegranate peel extract on chronic myeloid leukemia, K562 cells. ***Int J Appl Basic Med Res.*** 2015; 5(2): 100-5.
[20] 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.
[21] Dana N, Javanmard Sh, Rafiee L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of black pomegranate peel extract on melanoma cell line. ***Res Pharm Sci*** 2015; 10(2): 117-24.
[22] Deng Y, Li Y, Yang F, Zeng A, Yang S, Luo Y, et al. The extract from Punica granatum (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. ***Biomed Pharmacother*** 2017; 93: 976-84.
[23] Lee SH, Lee EJ, Min KH, Hur GY, Lee SH, Lee SY, et al. Quercetin Enhances Chemosensitivity to Gemcitabine in Lung Cancer Cells by Inhibiting Heat Shock Protein 70 Expression. ***Clin Lung Cancer*** 2015; 16(6): e235-243.
[24] Shan BE, Wang MX, Li RQ. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. ***Cancer Invest.*** 2009; 27(6): 604-12.
[25] Liu KC, Yen CY, Wu RS, Yang JS, Lu HF, Lu KW, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of human prostate cancer PC-3 cells. ***Environ Toxicol.*** 2014; 29(4): 428-39.
[26] Kim JY, Kim EH, Park SS, Lim JH, Kwon TK, Choi KS. Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation. ***J Cell Biochem*** 2008; 105(6): 1386-98.
[27] Jung YH, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim YH. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. ***Life Sci*** 2010; 86(9-10): 351-7.
[28] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. ***Science.*** 2003; 302(5651): 1704-1.۷۰۹
[29] Liu X, Ji Q, Fan Z, Li Q. Cellular signaling pathways implicated in metastasis of colorectal cancer and the associated targeted agents. ***Future Oncol.*** 2015; 11(21): 2911-22.
[30] Lai WW, Hsu SC, Chueh FS, Chen YY, Yang JS, Lin JP, et al. Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF-kappaB and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. ***Anticancer Res.*** 2013; 33(5): 1941-50.
[31] Bagheri M, Fazli M ,Saeednia S, Kor A, Ahmadiankia N. Pomegranate peel extract inhibits expression of beta-catenin, epithelial mesenchymal transition, and metastasis in triple negative breast cancer cells. ***Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).*** 2018; 64(7): 86-91.

#

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-03-28]