تأثير المستخلص الخام لثمرة الرمان على خلايا سرطان الكبد البشرية HepG٢

إعداد
ورود علي أحمد هارون

إشراف
د. أيمن إبراهيم أحمد القاضي
أ.د. أسامة عبدالله حسين أبوزنادة

المستخلص

يعتبر سرطان الخلايا الكبدية (HCC) واحد من الأسباب الشائعة للوفيات المرتبطة بالسرطان في جميع أنحاء العالم. ولا يزال معدل الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية مرتفع في العالم النامي، خصوصا في المناطق التي تعاني من فيروس الالتهاب الكبدي المزمن بي و سي. و يمكن تقليل النتيجة المدمرة للسرطان فقط باستخدام عوامل علاجية فعالة. تهدف التجارب العلمية لإيجاد مركبات بديلة مضادة للسرطان من مصادر ومستخلصات طبيعية , والتي تظهر آلية جديدة للوقاية من السرطان بواسطة مركبات انتقائية نشطة حيويا. وقد شاع استخدام مستخلص فاكهة الرمان في العديد من نظم الطب لتأثيرها على مجموعة متنوعة من الأمراض البشرية. تهدف الدراسة الحالية إلى اختبار التأثير المضاد للسرطان لمستخلص قشر الرمان و تحفيزه للموت الخلوي المبرمج في خلايا سرطان الكبد البشرية (HepG2) و معرفة الآلية الجزيئية التي يتبعها في ذلك.

الطرق: تم فحص قابلية حياة و نمو الخلية من خلال اختبارMTT . كما تم تقييم مدى قدرة الخلايا على تكوينها للمستعمرات السرطانية. تم صبغ الخلايا بعدة صبغات (قيمسا , اكريدين اورانج/ايثيديوم بروميد , هوكست ٣٣٣٤٢) للكشف عن التغيرات المورفولوجيا المصاحبة لموت الخلايا المبرمج. و تم الكشف عن الأضرار الناتجة على الحمض النووي عن طريق إجراء اختبار المذنب و اختبار تكسر المادة الوراثية. تم رصد الموت الخلوي المبرمج بواسطة تحليل التدفق الخلوي. وتمت دراسة التغيرات الطارئة على الجهد الغشائي للميتوكوندريا بواسطة اختبار JC-1 وتم قياس مستوى الأكسجين التفاعلي عن طريق اختبار 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. و أخيراً, تم تحديد مستويات التعبير الجيني في الجينات المحفزة للموت الخلوي المبرمج عن طريق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي اللحظي (Reverse transcription-quantitative PCR).

النتائج: أشارت البيانات من اختبار MTT إلى أن مستخلص قشر الرمان قادرو بشكل كبير على تثبيط نمو خلايا الكبد البشرية بطريقة تعتمد على الجرعة و الوقت. كما أظهرت النتائج تثبيط تشكل المستعمرات السرطانية بناءاً على الجرعات المستخدمة على الخلايا. و ظهرت بعض السمات المورفولوجيا الدالة على الموت الخلوي المبرمج كتجزئة الحمض النووي و تكثف الكروماتين في الخلايا المعالجة بالمستخلص. وأكدت نتائج اختبار المذنب و اختبار تكسر المادة الوراثية و تحليل التدفق الخلوي على تحفيز المستخلص لموت الخلايا المبرمج و ارتفاع نسبته. بالإضافة إلى ذلك, أظهرت الخلايا المعالجة بالمستخلص انخفاضاً واضحاً في مستوى الأكسجين التفاعلي و تغير في الجهد الغشائي للميتوكوندريا , و أيضاً ظهر و بشكل ملحوظ ارتفاع في مستويات التعبير الجيني للجينات المحفزة للموت الخلوي المبرمج .

الاستنتاج: تشير هذه النتائج و بقوة إلى أن مستخلص قشر الرمان قادر على تثبيط انتشار و تكاثر خلايا سرطان الكبد البشرية (HepG2)عن طريق تحفيز الموت الخلوي المبرمج.

Effect of Pomegranate Fruit Crude Extract on Human Hepatocellular Carcinoma Cells, HepG2

By
Worud Ali Ahmed Haroon
Supervised By
Dr. Ayman Ibrahim A. Elkady
Prof. Osama Abdullah H. Abu Zinadah

Abstract

Background: Hepatocellular cancer (HCC) is one of the common causes of cancer-related deaths worldwide. The incidence of HCC continues to rise in the developing world, particularly in areas with chronic viral hepatitis B and C infection. The destructive outcome of cancer can be reduced by only the use of effective therapeutic agents. Scientific trials are made to find alternative anticancer compounds from natural product extracts that show a novel mechanism for cancer prevention by selective bioactive components . Pomegranate fruit (*Punica granatum L.*) extract have been widely used in several systems of medicine for their effect on a variety of human ailments. The present study aimed to investigate the *in vitro* anticancer behaviors and apoptotic effects of the Pomegranate peel extract (PPE) against human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2).

Methods: Cell viability and effects of the extract on the cells were examined by MTT assay and clonogenic assay. Cells were stained with Giemsa, acridine orange / ethidium bromide and Hoechst 33342 to detect the cellular morphology of apoptosis. Single cell gel electrophoresis and DNA fragmentation assays were used to test DNA damage. Apoptosis induction was monitored by flow cytometry. The changes in mitochondrial membrane potential was studied by Jc-1 assay and reactive oxygen species (ROS) level was measured by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The expression levels of pro-apoptotic genes were determined by Reverse transcription-quantitative PCR.

Results: Data from MTT viability assay indicated that PPE significantly inhibited cell proliferation of HepG2 cells in a dose and time dependent manner. The clonogenic assay showed a dose-dependent inhibition of colony formation in PPE-treated cells. chromatin condensation and nuclear fragmentation, which are the typical morphological features of apoptosis, were found following PPE treatment of HepG2 cells. Single cell gel electrophoresis and DNA fragmentation confirmed the induction of apoptosis by PPE. Flow cytometric analysis of annexin V-propidium iodide staining demonstrated that treatment of HepG2 cells with PPE increased apoptotic cell population in a dose dependent manner. The results showed that PPE treatment induced oxidative stress, characterized by increased reactive oxygen species (ROS). The mechanistic investigation showed that PPE caused a significant loss in the mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome c into the cytosol. In addition, PPE treatment markedly up-regulated the mRNA expression levels of Noxa, Bax and Bad.

Conclusion: These results strongly suggest that PPE inhibited the proliferation of HepG2 cells by inducing apoptosis.