Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effect of hydroalcoholic extract of *Berberis vulgaris* L. fruit on the amount of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of chicken embryos

Fereshteh Roygari[1], Sholeh Gholasimod*[2], Nader Ghaleh Golab[3]

ABSTRACT

Background and Aims: Cancer, which is characterized by irregular cell metabolism and the development of metastasis risk, is still a significant risk and life-threatening. Although there are several unique advantages for cancer treatment, some problems, such as poor drug targeting efficacy, increased tumor hypoxia, severe coronary syndromes, excessive ventricular conduction, and drug-induced drug resistance, have emerged in recent years. Chemotherapy and increased risk of tumor metastasis have limited their potential clinical use.

Materials and Methods: In this experimental study, a total of 36 embryonic eggs were randomly selected. Then, four treatments, including control, 40, 80, and 120 µg/ml hydroalcoholic extract of *Berberis vulgaris* (*B. vulgaris*) fruit, and nine replications were tested. On the third day of incubation, the eggs were exposed to an open window, and on the eighth day, the experimental groups were treated with 40, 80 and 120 µg/ml alcoholic extract of *B. vulgaris* fruit, which was collected from Qaen city in South Khorasan Province, Iran. On the 12th day, the chorioallantoic membrane of all samples was photographed using a photo stereomicroscope, the numbers/diameters of vascular branches were measured using the Image J software (1.46r), and the resulting data were analyzed using the SPSS software (version 22) and the least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.01$)

Results: The mean number of vessels in the experimental groups was equal to (6.23+0.81) and (22.89+0.81), which indicated a significant dose-dependent reduction compared to the mean number of vessels measured in the control group (15.73+0.29) and (53.87+2.07) (P=0.003).

Conclusion: The use of the hydroalcoholic extract of *B. vulgaris* in three doses of 40, 80, and 120 µg/ml can reduce the number of branches and the diameter of vessels in the chorioallantoic membrane of chicken embryos, which indicates the process of angiogenesis inhibition.

Keywords: Angiogenesis, *Berberis vulgaris*, Chorioallantoic membrane, Hydroalcoholic extract

Citation: Gholasimod Sh, Roygari F, Ghaleh Golab N. [Effect of hydroalcoholic extract of Berberis vulgaris L. fruit on the amount of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of chicken embryos]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(1): 68-78. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.31.1.68

Received: January 9, 2024 **Accepted:** May 9, 2024

[1] Master's Student in Biotechnology, Faculty of Natural Sciences and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran
[2] Department of Watershed and Pasture Management, Faculty of Natural Sciences and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran
[3] Razi Vaccine and Serum Production, Shiraz, Iran

***Corresponding author:** Department of Watershed and Pasture Management, Faculty of Natural Sciences and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran E-mail: sgholasimod@birjand.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه *Berberis vulgaris* L. بر میزان رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک جنین مرغ

فرشته رویگری[1]، شعله قلاسی مود[2]*، نادر قلعه گلاب[3]

چکیده

زمینه و هدف: سرطان که با متابولیسم سلولی نامنظم و توسعه خطر متاستاز مشخص می‌شود، همچنان یک خطر بزرگ و کشنده برای زندگی انسان است. اگرچه چندین مزیت منحصر به فرد برای درمان سرطان وجود دارد، در سال‌های اخیر، مشکلاتی مانند اثربخشی ضعیف هدف‌گیری داروها، افزایش هیپوکسی تومور، سندرم‌های شدید کرونری، هدایت بطنی بیش از حد، مقاومت دارویی ناشی از داروهای شیمی درمانی و افزایش خطر متاستاز تومور، استفاده بالقوه آن‌ها را در بالینی محدود کرده است.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۶ عدد تخم مرغ جنین‌دار به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و چهار تیمار شاهد ۱۲۰ µg/ml و ۸۰، ۴۰ عصاره هیدروالکلی میوه زرشک و ۹ تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. در روز سوم انکوباسیون بر روی تخم‌مرغ¬ها پنجره¬ای باز و روز هشتم با عصاره میوه زرشک که از استان خراسان جنوبی (قاین) جمع¬آوری گردید، تیمارشدند. در روز دوازدهم از پرده کوریوالانتوئیک تمام نمونه¬ها به کمک فتواستریومیکروسکوپ عکس‌برداری شد، تعداد و قطر انشعابات عروق با کمک نرم‌افزار Image J (نسخه 1.46r) اندازه‌گیری و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون LSD تحلیل شدند (P≤۰/۰۱).

یافته‌ها: میانگین تعداد و قطر عروق در گروه‌های تجربی به ترتیب به میزان (۰/۱۳±۶/۲۳) و (۰/۸۱±۲۲/۸۹) بود که در مقایسه با میانگین تعداد و قطر عروق اندازه‌گیری شده در گروه شاهد به ترتیب به میزان (۰/۲۹±۱۵/۷۳) و (۸۷/۰۷±۵۳/۲) به صورت وابسته به دوز کاهش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۰۳).

نتیجه‌گیری: برطبق مطالعات انجام شده در این پژوهش استفاده از عصاره هیدروالکلی میوه گیاه زرشک می‌تواند سبب کاهش تعداد انشعابات و قطر عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه شود که این امر نشان‌دهنده فرایند مهار رگ‌زایی است.

واژه‌های کلیدی: رگ‌زایی، زرشک، پرده کوریوآلانتوئیک، عصاره هیدروالکلی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱(۱): ۷۸-۶۸.

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[2] گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[3] مدیر تولید موسسه واکسن و سرم سازی رازی شیراز، شیراز، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: شهر بیرجند- دانشگاه بیرجند- دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست- گروه مرتع و آبخیزداری

تلفن: ۰۹۱۵۷۵۶۲۷۰۴ پست الکترونیکی:sgholasimod@birjand.aci.ir

مقدمه

رگ‌های جدید، در بزرگسالان از شبکه عروقی جنینی ایجاد می‌گردد (۱). واسکولوژنز[1]، فرآیندی است که در آن سلول‌های اندوتلیال از پیش‌سازهای سلول‌های اندوتلیالی که آنژیوبلاست[2] نام دارند، تشکیل می‌گردند (۲). در طی این فرآیند آنژیوبلاست‌ها تکثیر می‌یابند و با هم ائتلاف و ساختارهای اولیه رگی را ایجاد می‌نمایند. پس از شکل‌گیری شبکه رگی اولیه، در طی فرآیندی دیگر یعنی رگ‌زایی[3] شبکه عروقی با جوانه‌زنی رگ‌های جدید از رگ‌هایی که از قبل ایجاد شده‌اند تکوین می‌یابد (۳). رگ‌های خونی نقش مهمی در رشد جنین، رشد بدن و بهبود زخم‌ها دارند (۴)، این در حالی است که در بالغین رگ‌زایی محدود است و فقط در طی سیکل تخمدان و فرآیندهای ترمیمی فیزیولوژیکی همچون ترمیم زخم انجام می‌گیرد. مهم‌ترین محرک‌های فیزیولوژیکی رگ‌زایی، ایسکمی بافتی، هیپوکسی و التهاب هستند و علاوه بر آن برخی از فاکتورهای اختصاصی ازقبیل فاکتور رشد رگی، سیتوکین‌های التهابی، مولکول‌های چسبنده و نیتریک‌اکساید رگ‌زایی را تحریک و یا مهار می‌کنند (۵). از بین تمام این عوامل پیش رگ‌زایی فعال شده، HIF[4] و VEGFA[5]، یک میتوژن اندوتلیال قوی و پروتئینی برجسته در فرایند رگ‌زایی است زیرا در بسیاری از تومورهای انسانی به شدت بیان می‌شود (۶). در پستانداران، خانواده VEGF دارای شش عضو است که شامل: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF و فاکتور رشد جفتی (PGF[6]) می‌باشد (۷, ۸)، اعضای خانواده VEGF به سه گیرنده تیروزین کیناز (VEGFR1[7], VEGFR2 و VEGFR3) به‌صورت همپوشانی متصل می‌شوند (۹). VEGFR[1] و VEGFR[2] عمدتاً در سلول‌های بنیادی اندوتلیال عروقی (ESC)[8] بیان می‌شوند، این درحالی است که VEGFR3 در ECهای لنفاوی بیان می‌شود. VEGFR2 دارای فعالیت پیش رگ‌زایی قوی‌تر و فعالیت تیروزین کیناز بالاتری نسبت به VEGFR1 است (۱۰). VEGFA پاسخ‌های رگ‌زایی درون تنی را عمدتاً از طریق فعال‌سازی VEGFR2 میانجی‌گری می‌کند. آزمایش‌هایی با حذف VEGF در موش‌ها و حذف VEGF در گورخرماهی، نقش مسیر VEGF را در توسعه عروق خونی و لنفاوی نشان داد. حذف ژنتیکی VEGFA یا گیرنده سیگنالینگ اصلی آن VEGFR2 منجر به مرگ جنینی اولیه (در مرحله جنینی E9) می‌شود که با محاصره تقریباً کامل خون‌سازی و رشد عروقی همراه است (۷). VEGF نقش مهمی در چرخه تولید مثل زنان دارد (۱۱). در بالغین تغییرات اندکی در سلول‌ها رخ می‌دهد، در واقع این سلول‌ها در بلوغ خاموش هستند ولی توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند به‌عبارت دیگر می‌توان رگ‌زایی را یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی بدن دانست که با واسطه تعادل بین فاکتورهای القاء کننده و مهار کننده رگ‌زایی تنظیم می‌گردد و در صورتی‌که این تعادل از بین برود زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (۱۲).

نئوواسکولاریزاسیون (NV[9]) یک فرآیند مهم برای رشد و متاستاز تومورها است و برای انتقال مواد مغذی و حذف مواد زائد متابولیک از سلول‌های تومور استفاده می‌شود. چندین مطالعه نشان داده‌اند که نئوواسکولاریزاسیون برای رشد تومورهایی که اندازه قطر آن‌ها بیش از ۱–۲ میلی‌متر است ضروری است (۱۳). موفقیت درمان ضد رگ‌زایی به نوع سرطان و مرحله سرطان در زمان تشخیص بستگی دارد. برخی از مطالعات اثر درمانی بهتر درمان ضد رگ‌زایی را در بیماران سرطانی هنگامی که با سایر استراتژی های ایمونوتراپی ترکیب می‌شود نشان داده‌اند (۱۴). بربرین ترکیب آلکالوئیدی موجود در عصاره میوه زرشک از پیش التهابی عروق جلوگیری نموده و مهارکننده متالوپروتئیناز و اینترلوکین۲ و ۶ می‌باشد و اثرات ضد رگ‌زایی را نشان داده است و از بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[10] VEGF جلوگیری می‌کند. همچنین از طریق مهار ظرفیت کارسینوم سلول‌های کبدی برای تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسانی[11](HUVEC) و نقش ضد رگ‌زایی ایفا می‌کند

[1] Vasculogenesis
[2] Angioblast
[3] Angiogenesis
[4] Hypoxia-inducible factors (HIFs)
[5] Vascular endothelial growth factor (VEGF)
[6] Placental Growth Factor (PGF)
[7] Receptors for vascular endothelial growth factor (VEGFR)
[8] Endothelial stem cells (ESCs)
[9] Neovascularization
[10] Vascular endothelial Growth factor (VEGF)
[11] Human Vein Endothelial Cells (HUVEC)

(۱۵) در این تحقیق ار عصاره هیدروالکلی میوه زرشک استفاده گردید که به میزان مشخصی دارای آلکالوئید بربرین است، تا اثر آن روی رگ‌زایی در جنین جوجه مرغ مورد بررسی قرار گیرد.

روش تحقیق

عصاره‌گیری

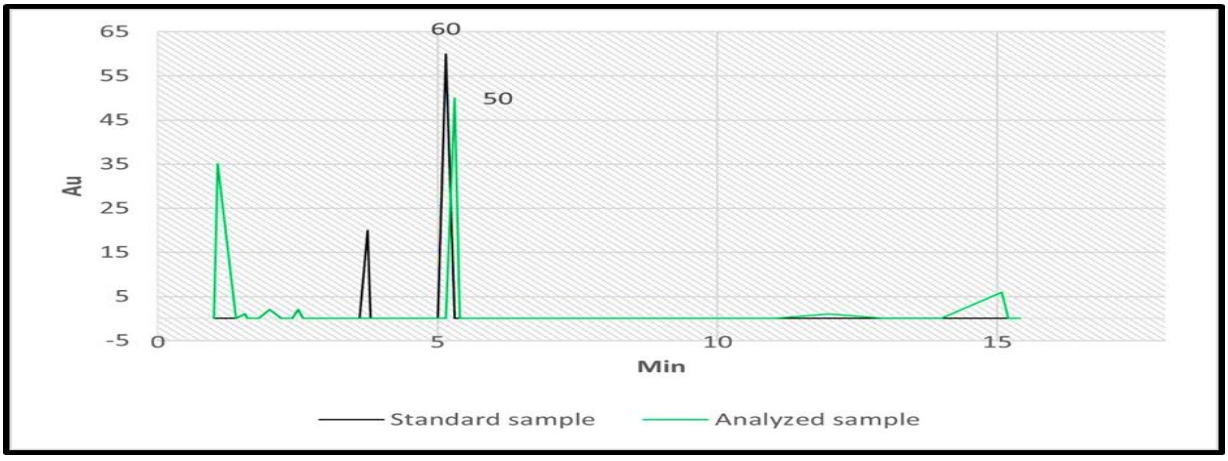
میوه گیاه *Berberis vulgaris* L. با شماره هرباریوم ۲۶۷۰ درختچه‌ای از خانواده Berberidaceae جمع‌آوری شده در آبان ماه از منطقه قائنات خراسان جنوبی (جدول ۱)، در مکانی دور از نور خورشید با هوادهی کافی خشک شده و درنهایت ۲۰۰ گرم از پودر خشک شده به مدت ۷۲ ساعت درون پرکولاتور با اتانول ۷۰٪ گذاشته شد. محلول حاصل حاوی عصاره گیاهی به همراه مقادیر بالایی از الکل است به همین ترتیب عصاره به‌دست آمده در روتاری قرار داده شد تا حد ممکن تبخیر در عصاره به‌دست آمده صورت گیرد و در نهایت ساختار لواشکی از عصاره به‌دست آمد. نمونه تا زمان انجام آزمایش درون یخچال نگهداری گردید (۱۶).

جداسازی ترکیبات پلی فنلی به وسیله HPLC

در این تست از دستگاه HPLC مدل Shimadzu RID-10A به منظور شناسایی ترکیبات آلکالوئیدی عصاره اتانولی میوه گیاه زرشک استفاده شد. استخراج به وسیله دتکتور مدل RIU or higher در طول موج ۳۴۰ nm به مدت ۲ ساعت انجام گردید، که بر این اساس ۵/۱۴ دقیقه طول کشید تا بعد از تزریق، هر ملکول از ستون دستگاه آنالیز عبور کند و آلکالوئید بربرین از نمونه استاندارد استخراج گردد و در زمان ۵/۲۲ دقیقه آلکالوئید بربرین از عصاره استخراج شده به روش پرکولاتور از میوه گیاه زرشک به دست آمد (شکل ۱).

جدول ۱-ویژگی¬های جغرافیایی محل جمع¬آوری گونه مورد مطالعه

نام گونه	محل جمع آوری	شماره هرباریوم	مشخصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (m)	میانگین دما (°C)	میانگین بارش سالیانه (mm)	میانگین رطوبت سالانه
Berberis vulgaris	خراسان جنوبی- قائن	۲۶۷۰	$33°44'06.3"N$ $59°10'46.5"E$	۱۴۳۲	۱۶	mm۱۲۰	۳۸٪



شکل ۱- کروماتوگرافی HPLC ، اندازه‌گیری شده در ۳۴۰ نانومتر که در زمان ۰:۵:۱۴ بربرین از نمونه استاندارد (Au۵۰) و در زمان ۰:۵:۲۲ ثانیه از عصاره هیدروالکلی تهیه شده از میوه زرشک (AU۶۰) استخراج شده است.

تهیه تیمارها

نمونه تزریقی در ۳ غلظت ۴۰µg/ml، ۸۰µg/ml و ۱۲۰µg/ml به صورت محلول در آب تهیه گردید. غلظت¬های مورد نظر بر اساس مطالعات اولیه روی جنین انجام گرفت به نحوی که غلظت¬های بالا باعث مرگ جنین و غلظت–های کم روی جنین بی اثر نباشد (۱۷،۱۸،۱۹،۲۰). پس از فیلتراسیون با فیلتر (pore size) ۰/۲۲ µm به میزان ۲۰ lµ به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار تزریق شد این میزان بر اساس تست زنده مانی MTT (احیاء نمک تترازولیوم) برروی سلول‌های فیبروبلاست جنین انجام شد.

سنجش پرده کوریوآلانتوئیک (CAM)[1]

۳۶ عدد تخم مرغ جنین‌دار از مرکز واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز تهیه گردید. تخم مرغ‌ها ابتدا در دستگاه انکوباتور با دمای C ۳۷.° و رطوبت ۶۵ الی ۷۰٪ قرار گرفتند، در روز سوم تخم‌مرغ‌ها از دستگاه خارج شده و سپس در زیر هود لامینار استریل به کمک پنس استریل برروی قسمت پهن تخم‌مرغ (بخش حفره هوایی تخم‌مرغ) سوراخی ایجاد گردید و همچنین در سمت پهلوی تخم مرغ پنجره‌ای به ابعاد ۱×۱ میلی متر باز شد، حفره به وسیله لامل و پارافین استریل بسته شد و تخم مرغ‌ها مجدد درون دستگاه انکوباتور قرار گرفتند تا روز هشتم، در روز هشتم تخم‌مرغ‌ها از دستگاه خارج شده زنده مانی آن‌ها به واسطه حرکت جنین و پایداری پرده کوریوآلانتوئیک به صورت مشاهده مستقیم از حفره باز شده بررسی شد، در نهایت آزمایش در چهار گروه آزمایشی، گروه شاهد و گروه–های تجربی (پایین ترین مقدار غلظت دارو و غلظت متوسط و بالاترین میزان غلظت دارو) انجام شد (۲۲, ۲۱).

گروه شاهد

نمونه‌ها درون دستگاه انکوباسیون تا روز دوازدهم با دمای C ۳۷.° و رطوبت ۶۰ الی ۷۰٪ قرار گرفتند.

گروه تجربی A

نمونه‌ها در روز هشتم انکوباسیون تخم مرغ‌ها از دستگاه خارج گشته و توسط µl ۲۰۰ عصاره آبی زرشک با غلظت µg/ml ۴۰ تیمار شدند و مجدد تا روز دوازدهم درون دستگاه انکوباتور با دمای C ۳۷.° و رطوبت ۶۰ الی ۷۰٪ قرار گرفتند.

گروه تجربی B

نمونه‌ها روز هشتم انکوباسیون تخم مرغ‌ها از دستگاه خارج گشته وتوسط µl ۲۰۰ عصاره آبی زرشک با غلظت µg/ml ۸۰ تیمار شدند و مجدد تا روز دوازدهم درون دستگاه انکوباتور با دمای C ۳۷.° و رطوبت ۶۰ الی ۷۰٪ قرار گرفتند.

گروه تجربی C

در روز هشتم انکوباسیون تخم مرغ‌ها از دستگاه خارج گشته وتوسط µl ۲۰۰ عصاره آبی زرشک با غلظت µg/ml ۱۲۰ تیمار شدند و مجدد تا روز دوازدهم درون دستگاه انکوباتور با دمای C ۳۷.° و رطوبت ۶۰ الی ۷۰٪ قرار گرفتند.

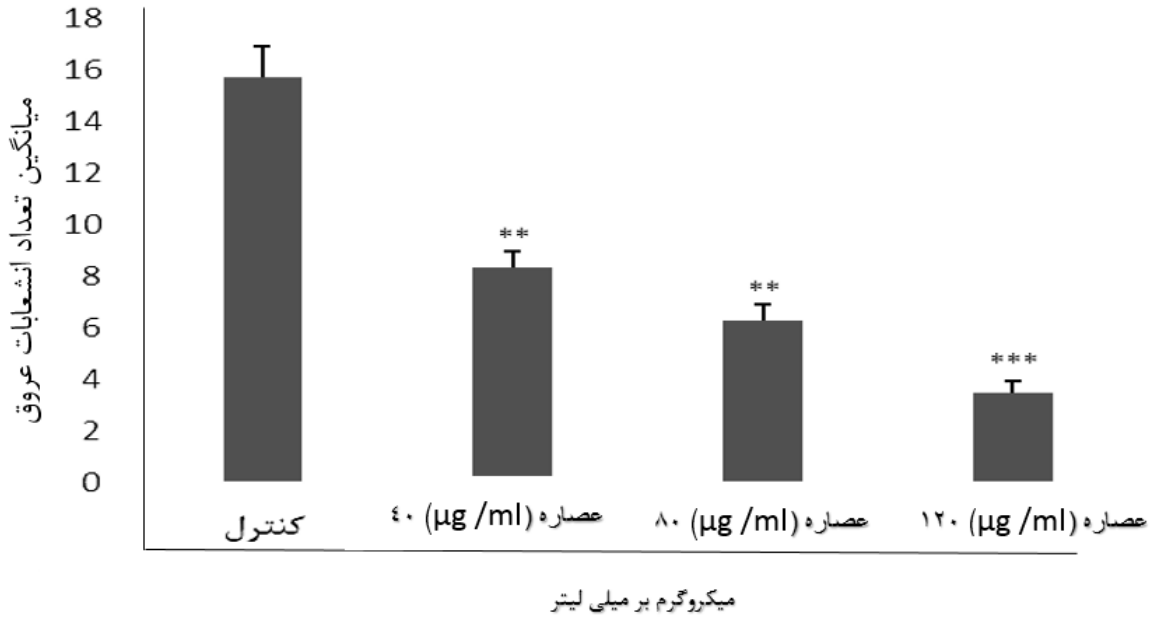
زمان‌ها با توجه به شکل گیری پرده کوریوآلانتوئیک و توسعه عروق در تمام مقالات مشابه انجام شده برروی CAM در نظر گرفته شده است (۲۱،۲۲). از پرده کوریوآلانتوئیک به کمک فتواستریومیکروسکوپ (Ziess، آلمان) با بزرگ نمایی ۶۴ برابر عکس گرفته و به کمک آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار Image J در صفحه نمایش ۱۵ اینچی بررسی شد. اندازه‌گیری شاخص تعداد عروق و قطر انشعابات در مربع‌هایی به ابعاد cm ۲×۲ انجام شد.

آنالیزهای آماری: پس از کنترل نرمال بودن باقی¬مانده داده¬ها، تجزیه آماری داده¬ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین داده¬ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم شد.

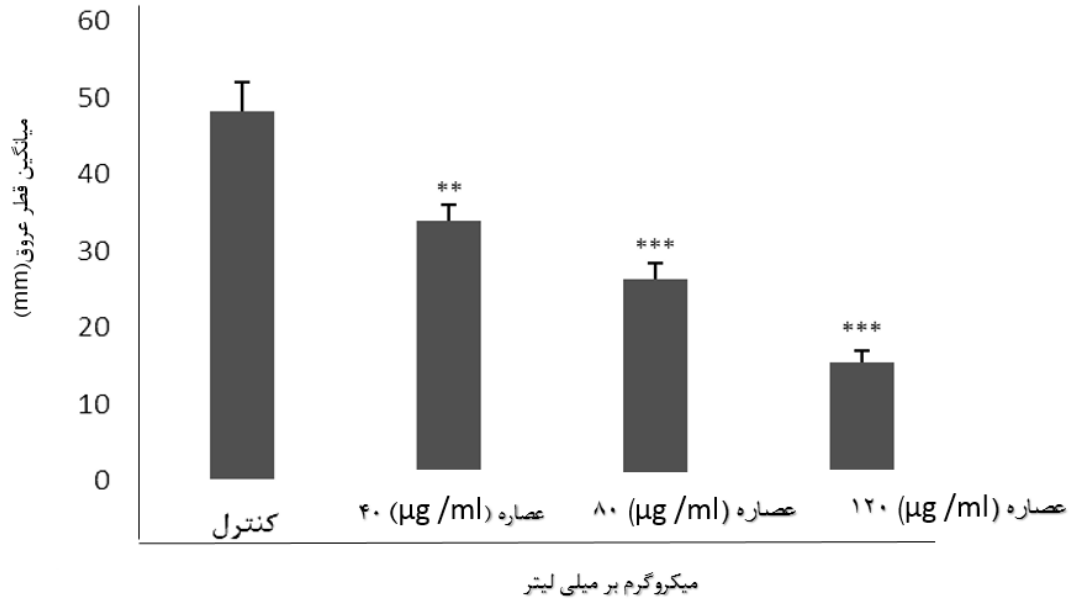
[1] *Chorioallantoic membrane* (CAM)

یافته‌ها

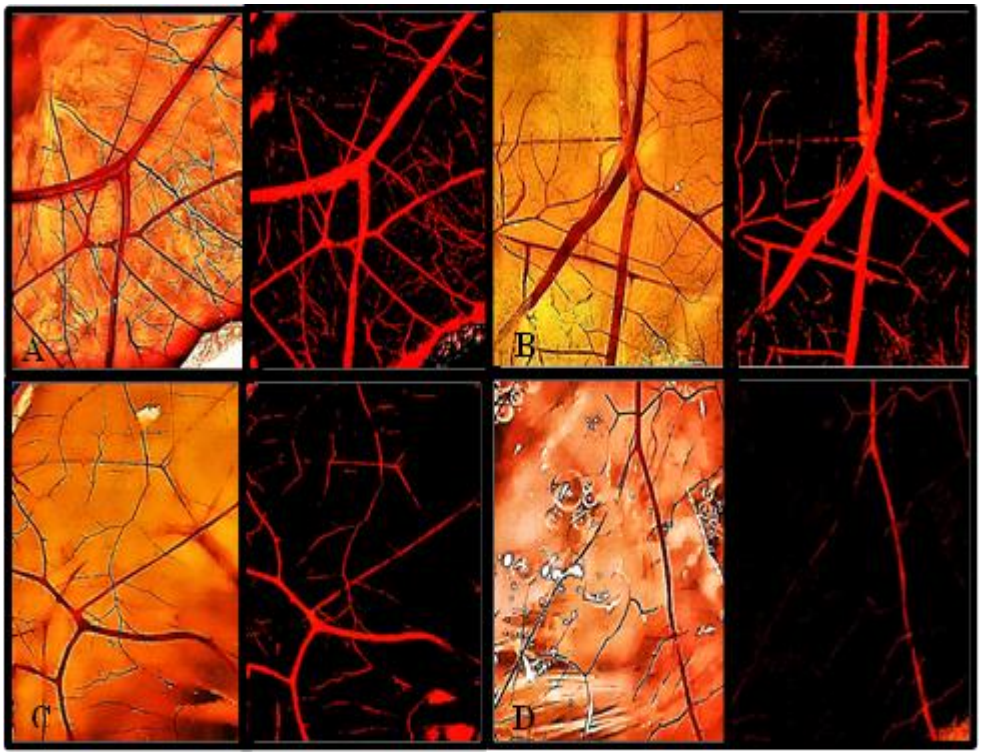
نتاج تجزیه واریانس داده¬ها نشان داد که تیمار عصاره هیدروالکلی میوه زرشک تأثیر معنی‌داری بر تعداد انشعابات عروق (P<۰/۰۱) و مجموع قطر عروق خونی (P<۰/۰۱) در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه داشت. کمترین تعداد انشعابات عروق خونی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین در تیمار ۱۲۰ µg/ml عصاره هیدرولیکی میوه زرشک (به مقدار ۳/۵۱) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (نمودار ۱). مقایسه میانگین مجموع قطر عروق خونی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه نشان داد تیمار عصاره هیدرولیکی میوه زرشک در تمامی سطوح بکار برده شده باعث کاهش معنی‌دار قطر عروق خونی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد تیمار) شد (نمودار ۲). با کاهش قطر رگ اصلی و کاهش تعداد انشعابات در جنین هیچ گونه اختلال کاهش وزن، کوتولگی وناهنجاری در جنین‌های تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی زرشک نسبت به گروه کنترل دیده نشد. تصاویر به‌دست آمده در نرم‌افزار Image J (شکل ۲) نشان می‌دهد با تزریق عصاره قطر و تعداد انشعابات رگ‌ها کاهش می‌یابد. تصویر D نشان می¬دهد که بیشترین مهار رگ زایی در غلظت۱۲۰µg/mlمی‌باشد. هرچقدر میزان گراف¬ها در طول محور y¬ها بلند¬تر (y بزرگ¬تری داشته باشد) باشد، قطر آن رگ بر حسب پیکسل تصویر بیشتر است (نمودار ۳).



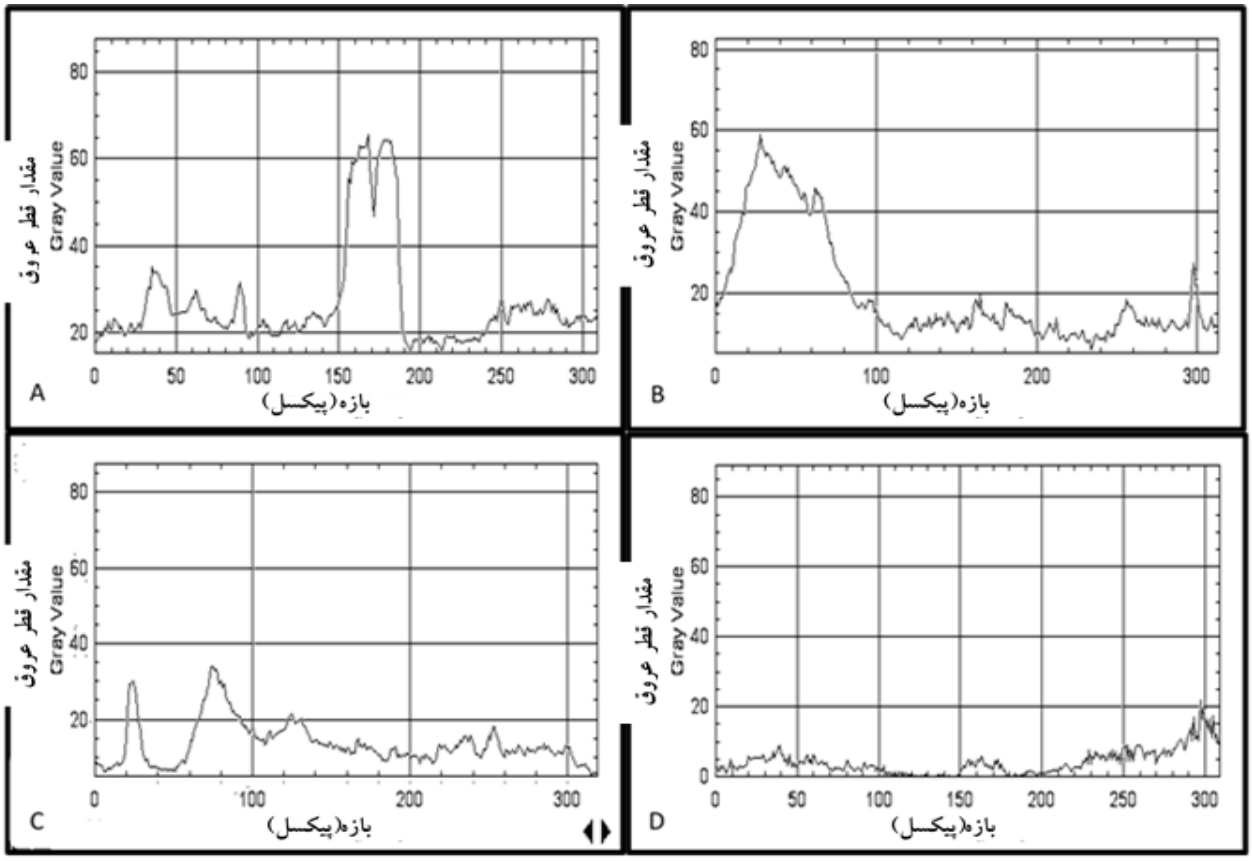
نمودار۱- میانگین تعداد انشعابات عروق در گروه‌های تجربی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی میوه زرشک و گروه شاهد (p< ۰/۰۱ ،***p< ۰/۰۰۱)**



نمودار ۲- میانگین قطر عروق در گروه‌های تجربی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی گیاه زرشک و گروه شاهد (*P<۰/۰۰۱، **P<۰/۰۱)**



شکل ۲- تصاویر عکس‌برداری شده به وسیله استریو میکروسکوپ ٦٤× از پرده کوریوآلانتوئیک (CAM)تحت تیمار با عصاره هیدرو الکلی گیاه زرشک که میزان عروق به وسیله نرم‌افزار ImageJ آنالیز شده است: (A گروه کنترل، B غلظت ۴۰ ماکروگرم بر میلی لیتر،C غلظت ۸۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر و D غلظت ۱۲۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر)



نمودار۳- اندازه قطر عروق بر حسب میزان پیکسل عکس‌های تهیه شده از گروه‌های آزمایشی (B, C, D) و کنترل (A)

بحث

پژوهش حاضر به صورت *in vivo* و برروی مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه با سه غلظت ۸۰،۴۰ و ۱۲۰ ماکرو گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی میوه زرشک انجام شد که باعث کاهش در تعداد و یا قطر انشعابات عروقی گردید. در تحقیقی مشابه، اثر بربرین بر EMT[1] در سلول‌های استئوسارکوم نشان داد که زنده ماندن سلولی و مهاجرت، تشکیل کلنی و بهبود زخم خراش سلول‌های استئوسارکوم توسط بربرین سرکوب شد (۲۳). علاوه بر این، اثرات مهاری بربرین در برابر بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز 2 -MMP نشان داده شد (۲۴) که تأیید کننده اثر ضد سرطانی بربرین می‌باشد.

بربرین AP-1[2] و NF-κB[3] را برای سرکوب MMP-9 تنظیم می‌کند. درمان با بربرین به طور قابل توجهی EGFR[4] را کاهش می‌دهد که در نتیجه منجر به کاهش فعالیت PI3K و AKT شده است. این دو عامل PI3K[5] و AKT[6] مسبب فعال‌سازی فرایندهای پایین دستی متاستاز از جمله بیان MMP-2، CyclinD1، MMP-9 و VEGF هستند، که با کاهش بیان آن متاستاز و رگ‌زایی نیز متوقف می‌گردد (۲۵).

فعال شدن EGFR با تنظیم افزایش بیان HIF-1α سبب افزایش بیان VEGF می‌شود، در زمان مقاومت اکتسابی EGFR/TKI، مسیر VEGF ممکن است منحصراً از سیگنال‌دهی EGFR برای حفظ رشد تومور عمل کند در نهایت مهار دو جانبه

[1] Epithelial-mesenchymal transition (EMT)
[2] Activator protein 1 (AP-1)
[3] nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF-kB)
[4] Epidermal growth factor receptor
[5] Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks)
[6] Protein kinase B (PKB).

EGFR/VEGF اثر ضد توموری قوی‌تری نسبت به تک درمانی در نمونه‌های جهش یافته دارد. در نهایت درمان با بربرین و متوقف کردن مسیر EGFR سبب توقف رگ‌زایی و متاستاز می‌شود (۱۲). مکانیسم اثر و پتانسیل درمانی بربرین در مدل خاص از NASH-HCC[1] بررسی کردند. همانطور که انتظار می‌رفت، تومورزایی در کبد موش تحت درمان با بربرین بسیار کاهش یافت. علاوه بر این، در موش‌های ST-HFHC[2]، افزایش بیان CD31 و VEGF توسط بربرین سرکوب شد و ویژگی ضد رگ‌زایی بالقوه آن را تأیید کرد (۲۶،۲۷). حتی بیشتر از آن، بربرین به طور قابل توجهی سطوح آنزیم‌های کبدی، گلوکز، لیپوپروتئین با چگالی بالا، لیپوپروتئین با چگالی کم و کلسترول کل و همچنین بیان IL-6، IL-1β، MCP-1 و TNF-α را کاهش داد (۲۸).

بربرین به‌دلیل از بین بردن رادیکال¬های آزاد، آنزیوژنز را در اجسام شبه جنینی مهار می¬کند (۲۹) و تعدیل کننده برنامه سلولی در سه سطح فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی، گلیکولیز و سنتز ماکروملکول در سرطان سینه به‌طور همزمان است (۳۰) و توانایی این ترکیب به‌علت مهار مسیر PI-3K/AKT می¬باشد (۳۱).

تأثیر برامین و مشتقات آن بر ممانعت از رشد سلول_های سرطانی کبد با هدف‌گیری کاهش فعالیت پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمادولین نشان داده شده است؛ زیرا بیان بیش از حد کلسیم/کالمادولین تکثیر سلول سرطانی کبد را موجب می_شود (۳۲).

نتیجه‌گیری

طبق مطالعات انجام شده در این پژوهش استفاده از میوه زرشک می‌تواند در هر سه غلظت استفاده شده بر روی مهار رگ‌زایی از طریق کاهش قطر و تعداد انشعابات عروق تأثیر گذارد؛ اما بیشترین بازدانگی در غلظت تزریقی ۱۲۰ µg/ml مشاهده شده است. با توجه به اهمیت آنژیوژنز و عوامل مهار کننده آن برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله تومورها، روش‌های مهار آنژیوژنز مسیر امیدوار کننده‌ای برای درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز محسوب می‌گردد. تحقیقات بیشتر می‌تواند در آگاهی بر احتمال استفاده کاربردی از عصاره میوه گیاه زرشک به عنوان دارو یا رژیم غذایی به منظور درمان بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها مؤثر واقع گردد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه بیرجند و کمیته اخلاق با کد IR.BIRJAND.REC.1402.003 انجام شد.

حمایت مالی

این تحقیق هیچ گونه حمایت مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان نامه تحت عنوان بررسی مقایسه‌ای اثر عصاره هیدروالکلی گیاه زرشک (*Berberis vulgaris* L.) و خارمریم (*Silybum marianum* L. Gaertn) بر میزان رگ‌زایی در سلول‌های توموری در مقطع کارشناسی‌ارشد در سال ۱۴۰۲ با کد اخلاق IR.BIRJAND.REC.1402.003 می-باشد که با حمایت دانشگاه بیرجند و همکاری دانشگاه علوم پزشکی شیراز اجرا شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه: شعله قلاسی‌مود، نادر قلعه‌گلاب

تحلیل و تفسیر داده‌ها: شعله قلاسی‌مود، نادر قلعه گلاب

تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته: فرشته رویگری

تحلیل آماری: شعله قلاسی‌مود

نظارت بر مطالعه: نادر قلعه‌گلاب

بازبینی نقادانه دست‌نوشته برای محتوای فکری: شعله قلاسی‌مود

[1] Nonalcoholic steatohepatitis-Hepatocellular Carcinoma (NASH-HCC)

[2] *Sargassum tenerrium*-High fat& High cholesterol (STZ-HFHC)

تضاد منافع

پژوهش حاضر وجود ندارد.

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در

منابع:

1- Herrera-Vargas AK, Garcia-Rodriguez E, Olea-Flores M, Mendoza-Catalan MA, Flores-Alfaro E, Navarro-Tito N. Pro-angiogenic activity and vasculogenic mimicry in the tumor microenvironment by leptin in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2021; 62: 23-41. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2021.10.006

2. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. J Cancer. 2020; 11(15): 4474-94. DOI: 10.7150/jca.44313

3. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. Cell Mol Life Sci. 2020; 77(9): 1745-70. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7

4. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. J Exp Clin Cancer Res. 2020; 39(1): 1-19. DOI: 10.1186/s13046-020-01709-5

5. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, Salehi E, Solhjoo S, Toolee H, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. J Cell Physiol. 2019; 234(5): 5700-21. [Persian] DOI: 10.1002/jcp.27425

6. Pandey P, Khan F, Upadhyay TK, Seungjoon M, Park MN, Kim B. New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. Biomed Pharmacother. 2023; 161: 114491. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114491

7. Aldinucci D, Borghese C, Casagrande N. The CCL5/CCR5 axis in cancer progression. Cancers. 2020; 12(7): 1765. DOI: 10.3390/cancers12071765

8. Lv F, Li X, Wang Y, Hao L. MAGP1 maintains tumorigenicity and angiogenesis of laryngeal cancer by activating Wnt/β-catenin/MMP7 pathway. Carcinogenesis. 2024; 45(4):220-34. DOI: 10.1093/carcin/bgad003

9. Ceci C, Atzori MG, Lacal PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: Experimental evidence in different metastatic cancer models. Int J Mol Sci. 2020; 21(4): 1388. DOI: 10.3390/ijms21041388

10. Yao C, Wu S, Kong J, Sun Y, Bai Y, Zhu R, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and anti-angiogenic therapies. Cancer Biol Med. 2023; 20(1): 25-43. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0449

11. Qi S, Deng S, Lian Z, Yu K. Novel drugs with high efficacy against tumor angiogenesis. Int J Mol Sci. 2022; 23(13): 6934. DOI: 10.3390/ijms23136934

12. Li H-X, Wang S-Q, Lian Z-X, Deng S-L, Yu K. Relationship between tumor infiltrating immune cells and tumor metastasis and its prognostic value in cancer. Cells. 2022; 12(1): 64. DOI: 10.3390/cells12010064

13. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. Signal Transduct Target Ther. 2021; 6(1): 94. DOI: 10.1038/s41392-020-00443-w

14. Fallah A, Sadeghinia A, Kahroba H, Samadi A, Heidari HR, Bradaran B, et al. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. Biomed Pharmacother. 2019; 110: 775-85. [Persian] DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.022

15. Almatroodi SA, Alsahli MA, Rahmani AH. Berberine: An important emphasis on its anticancer effects through modulation of various cell signaling pathways. Molecules. 2022; 27(18): 5889. DOI: 10.3390/molecules27185889

16. Salehi B, Selamoglu Z, Sener B, Kilic M, Kumar Jugran A, de Tommasi N, et al. Berberis plants—drifting from farm to food applications, phytotherapy, and phytopharmacology. Foods. 2019; 8(10): 522. [Persian] DOI: 10.3390/foods8100522

17. Song D, Hao J, Fan D. Biological properties and clinical applications of berberine. Front Med. 2020; 14(5): 564-82. DOI: 10.1007/s11684-019-0724-6

18. Hooshmand Moghadam B, Kordi MR, Mahdian S. The effect of Barberry Juice supplement on Prostaglandin E2 level caused by intense aerobic activity in active young girls. J Birjand Univ Med Sci. 2017; 24: 1-9. [Persian] URL: http://journal.bums.ac.ir/article-1-2235-en.html

19. Malhotra B, Kulkarni GT, Dhiman N, Joshi D, Chander S, Kharkwal A, et al. Recent advances on Berberis aristata emphasizing berberine alkaloid including phytochemistry, pharmacology and drug delivery system. J Herb Med. 2021; 27(6): 100433. DOI:10.1016/j.hermed.2021.100433

20. Rokade M, Vichare V, Neve T, Parande B, Dhole S. A review on anticancer potential of Berberis aristata and berberine with focus on quantitative methods. Journal of Preventive, Diagnostic and Treatment Strategies in Medicine. 2022; 1(2): 67-75. DOI: 10.4103/jpdtsm.jpdtsm_9_22

21. Moldovan C, Frumuzachi O, Babotă M, Menghini L, Cesa S, Gavan A, et al. Development of an Optimized Drying Process for the Recovery of Bioactive Compounds from the Autumn Fruits of Berberis vulgaris L. and Crataegus monogyna Jacq. Antioxidants. 2021; 10(10): 1579. DOI: 10.3390/antiox10101579

22. Shekarabi SPH, Mehrgan MS, Ramezani F, Dawood MA, Van Doan H, Moonmanee T, et al. Effect of dietary barberry fruit (Berberis vulgaris) extract on immune function, antioxidant capacity, antibacterial activity, and stress-related gene expression of Siberian sturgeon (Acipenser baerii).Aquac. Rep. 2022; 23: 101041. DOI:10.1016/j.aqrep.2022.101041

23. Mishra R, Nathani S, Varshney R, Sircar D, Roy P. Berberine reverses epithelial-mesenchymal transition and modulates histone methylation in osteosarcoma cells. Mol Biol Rep. 2020; 47(11): 8499-511. DOI: 10.1007/s11033-020-05892-8

24. Chavda VP, Nalla LV, Balar P, Bezbaruah R, Apostolopoulos V, Singla RK, et al. Advanced Phytochemical-Based Nanocarrier Systems for the Treatment of Breast Cancer. Cancers. 2023; 15(4): 1023. DOI: 10.3390/cancers15041023

25. Chuang TC, Wu K, Lin YY, Kuo HP, Kao MC, Wang V, et al. Dual down-regulation of EGFR and ErbB2 by berberine contributes to suppression of migration and invasion of human ovarian cancer cells. Environ Toxicol. 2021; 36(5): 737-47. DOI: 10.1002/tox.23076

26. Luo Y, Tian G, Zhuang Z, Chen J, You N, Zhuo L, et al. Berberine prevents non-alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma by inhibiting inflammation and angiogenesis in mice. Am J Transl Res. 2019; 11(5): 2668. PMCID: PMC6556646 PMCID: PMC6556646

27. Dyson J, Jaques B, Chattopadyhay D, Lochan R, Graham J, Das D, Aslam T, Patanwala I, Gaggar S, Cole M, Sumpter K, Stewart S, Rose J, Hudson M, Manas D, Reeves HL. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. J Hepatol. 2014;60: 110–117. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.08.011

28. Zheng R, Li F, Li F, Gong A. Targeting tumor vascularization: promising strategies for vascular normalization. J Cancer Res Clin Oncol. 2021; 147(9): 2489-505. DOI: 10.1007/s00432-021-03701-8

29. Campisi A, Acquaviva R, Mastrojeni S, Raciti G, Vanella A, De Pasquale R. Effect of berberine and Berberis aetnesis alkaloid extract on tissue trans glutaminase in primary astroglia cell cultures. Phytotherapy Research Journal, 2010, 25(6): 816-820. DOI: 10.1002/ptr.3340

30. Tan W,Li n, Tan R, Zhong Z, Suo Z, Yang X. 2014. Berberine interfered with breast cancer cells metabolism, balancing energy homeostasis. Anticancer Agents Med. Chem. 15(1): 66-78. DOI: 10.2174/18715206146661409101205l8

31. Kim S, Oh SJ, Lee J, Han J, Jeon M, Jung T, Nam SJ. Berberine suppresses TPA induced fibronectin expression through the inhibition of secretion in breast cancer cells. Cellular Physiology and Biochemistry. 2013, 32(5): 15341-1550. DOI: 10.1159/000356591

32. Meng Z, Li T, Ma X, Wang X, Ness C. Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca/calmadulin-dependent protein kinas II. Molecular Cancer Therapeutics. 2013, 12(10): 2067-77. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0314