

تأثیر سیلیبینین بر القاء آپوپتوز و مهار رشد سلولی در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

سید محمدباقر پیروزیپناه¹، سعید پیروزیپناه²، مهدی سبزیچی³، رقیه پاشایی اصل⁴، مریم پاشایی اصل⁵، ناصر صمدی⁶

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویان، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 2- استادیار گروه تغذیه و رژیم‌های درمانی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 3- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 4- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 5- استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 6- نویسنده مسئول: استادیار گروه بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران. پست الکترونیکی: drnsamadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: 93/3/11

تاریخ پذیرش: 93/6/11

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان یکی از رایج‌ترین عوامل مرگ و میر ناشی از بدخیمی در زنان است. سیلیبینین یک ترکیب فلاونولیگنان از گیاه خار مریم (*Silybum maianum*) استخراج شده و ویژگی ضد سرطانی آن در سلول‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه اثر سیلیبینین بر میزان بیان ژن *P53*، رشد و آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: با کشت سلول‌های MCF-7 در RPMI1640 و تیمار با سیلیبینین در غلظت‌های کنترل، 25 الی 800 میکرومول در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت با روش رنگ سنجی (MTT (MethylThiazolITetrazolium)، میزان رشد سلولی مورد بررسی قرار گرفت. میزان القاء آپوپتوز به روش فلوسایتومتری با رنگ آمیزی Annexin-V بررسی گردید. میزان بیان ژن *P53* توسط دستگاه Real-Time PCR بررسی شد. در نهایت تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار Spss ver16 صورت پذیرفت.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند، تأثیر مهار سیلیبینین در غلظت 200 میکرومول در 24 ساعت بر رشد و نیز القاء آپوپتوز سلولی قابل توجه بود ($P < 0/05$). انکوباسیون با سیلیبینین در 48 ساعت IC_{50} برابر با 148 میکرومول نشان داد ($P < 0/05$). داده‌های فلوسایتومتری نشان دادند که القاء آپوپتوز کاملاً مستقل از اثر سیتوتوکسیک سیلیبینین بوده است. سیلیبینین باعث افزایش بیان ژن *P53* همسو با افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده می‌گردد.

نتیجه گیری: سیلیبینین به صورت وابسته به دوز و زمان باعث کاهش رشد سلولی و القاء آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 می‌شد. همچنین سیلیبینین به صورت وابسته به دوز باعث بیان ژن *P53* شد. شواهد نشان می‌دهند که سیلیبینین می‌تواند به عنوان یک ماده ضد سرطان پستان در راستای مرگ سلولی از طریق مسیر آپوپتوز عمل نماید.

واژگان کلیدی: سیلیبینین، آپوپتوز، رشد سلولی، سرطان پستان، *P53*

• مقدمه

یکی از روش‌هایی که به‌طور سنتی برای کنترل پیشرفت بیماری سرطان پستان استفاده می‌شود، شیمی درمانی است (3). اما به دلیل عدم انتخابی بودن سمیت این دارو، عوارض جانبی و حتی آسیب‌های بافتی غیرقابل برگشتی در ارگان‌های سالم بدن به‌همراه دارد (4). از سویی مقاومت دارویی در روند درمان نیز پیش‌آگهی ضعیفی را ایجاد می‌نماید (5، 6).

سرطان دومین عامل مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی عروقی در بسیاری از جوامع از جمله ایران است (1). سرطان پستان با نرخ بروز 1/2 میلیون بیمار جدید در جهان در هر سال شایع‌ترین بدخیمی در بین زنان است و اولین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در آمریکا می‌باشد (2).

فنول‌های گیاهی کورکومین و کارنوسیک اسید باعث فعال شدن پروتئین‌های کاسپاز 8، 9 و 3 شدند (19).

تاکنون پژوهش‌های اندکی نقش سلیبینین در مهار تقسیم سلولی و نیز القاء آپوپتوز به صورت وابسته به دوز و زمان، را در نظر گرفته‌اند (20). از این رو در پژوهش حاضر اثر تیمار با سلیبینین بر ویژگی‌های سیتوتوکسیک، آپوپتوتیک و نیز تأثیرگذاری بر بیان ژنی P53 به عنوان محور ژنی بروز آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است.

• مواد و روش‌ها

کشت سلولی: در این پژوهش رده سلول‌های سرطان پستان MCF-7 (انسیتو پاستور ایران، تهران) مورد استفاده قرار گرفت. از محیط کشت RPMI 1640 (Gibco، آمریکا) غنی شده با 10 درصد سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco، آمریکا) و آنتی‌بیوتیک پنسیلین با نسبت 5% (Sigma Aldrich، آمریکا) استفاده شد. بعد از رسیدن سلول‌ها به سطح پوشش مناسب در پلیت‌های 96 خانه ای در هر چاهک به میزان 1×10^4 سلول کشت داده شد و 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5% درصد دی اکسید کربن و 95% رطوبت انکوباتور (سانبو، ژاپن) تیمار گردید. DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (99.9%) به عنوان حلال برای تهیه محلول پایه سلیبینین با مولاریته 482.44 استفاده شد. غلظت‌های مختلف سلیبینین (Aldrich-Sigma، آمریکا؛ Cat. no.: 22888-70-6) تیمار داده شده در محیط کشت شامل غلظت‌های ۰.۲۵، ۰.۵۰، ۱.۰۰، ۲.۰۰، ۴.۰۰، ۸.۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. انتخاب غلظت‌ها بر پایه پژوهش‌های پیشین و میزان IC_{50} مطالعات انجام شده روی سلول‌های سرطان پستان بود (20). طول مدت تیمار سلولی با ماده مداخله شامل 24، 48 و 72 ساعت بوده است. تیمار سلول‌ها بدون سلیبینین به عنوان کنترل منفی و یک گروه به عنوان کنترل با تیمار DMSO لحاظ شدند.

سنجش میزان رشد سلولی و سمیت دارو:

کیست (MTT (MethylThiazolTetrazolium) (Sigma) -Aldrich، آمریکا) با استفاده از رنگ-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide برای تعیین درصد فراوانی سلول‌های زنده MCF-7 مورد استفاده قرار گرفت. پلیت‌های 96 خانه‌ای حاوی سلول تیمار شده با رنگ MTT به مدت 4 ساعت انکوبه شده سپس با دور ریختن مایع رویی، بلورهای فورمازون (شاخص مولکولی سلول‌های زنده) در 225 میکرولیتر محلول DMSO و بافر سورنسون

بنابراین استفاده از ترکیب‌های گیاهی و نو با سمیت کمتر و عوارض جانبی کمتر از ضرورت مطالعاتی بسیاری برخوردار است (7).

از این رو در سال‌های اخیر نقش ترکیب‌های طبیعی موجود در رژیم غذایی به ویژه فلاونوئیدها در مهار سرطانزایی و درمان سرطان مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (6). فلاونوئیدها و مشتقات متابولیتی آنها دارای دو ویژگی مهم مهار آنزیم‌ها و اثر آنتی‌اکسیدانی هستند (8). از این دیدگاه فلاونوئیدها در کنترل و تنظیم بیان ژنی و مهار آنزیم‌های مؤثر در کارسینوژنز شرکت فعال دارند (6). در ضمن فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی شناخته شده و از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد با ریشه اکسیژنی محافظت می‌کنند. فلاونوئیدها از موتاسیون و آغاز مراحل سرطانزایی (Carcinogenesis) جلوگیری نموده و اخیراً مشاهده شده که باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) در سلول‌های سرطانی نیز می‌شوند (8، 6). سلیبینین (Silibinin) جزء ترکیبات طبقه بندی شده در زیرگروه فلاونولیکان‌ها می‌باشد. سلیبینین ماده مؤثره گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی (*Silybum marianum*) می‌باشد که اثرات ضد سرطانی آن به ویژه در هیپاتوسل کارسینوما نشان داده شده است (9، 8). سلیبینین در بهبود عملکرد قلبی، سم زدایی و بهبود عملکرد کبد، محافظت از برونشیت‌ها و کیسه صفرا تأثیر دارد (9). اثر ضد سرطانی سلیبینین به طور عمده در زمینه مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و مرگ سلولی (10)، ضد رگ‌زایی و مهاجرت سلولی (11)، در برخی از مطالعه‌ها بر روی رده‌های سلولی با شدت اثرات متفاوت نشان داده شده است (12). در ضمن سلیبینین اثری ویژه در القاء تمایز سلولی بین فلاونولیکان‌ها دارد (8). با این وجود سازوکار و مکانیسم مولکولی اثر ضد سرطانزایی سلیبینین کاملاً مشخص نشده است (12). پژوهش‌های زیادی نقش سلیبینین را در پیشگیری از شروع سرطان پروستات (13)، ویژگی ضد سرطانی و ضد التهابی در کبد (14)، مهار رشد و تقسیم سلولی در سرطان کولون (15)، القای آپوپتوز در سرطان ریه، پوست و مغز (17، 16) نشان داده‌اند. در مطالعه Tiwari و همکاران نشان داده شد که مسیر آپوپتوزی القا شده در سلول‌های سرطانی پستان از طریق مسیر میتوکندریایی می‌باشد ولی تأثیر سلیبینین بر میزان بیان ژن P53 بررسی نشده است (18). Pesakhov و همکاران در سلول‌های سرطان لوسمی میلوئید حاد نشان دادند که سلیبینین به همراه پلی

Rnase inhibitor جهت از بین بردن آلودگی سنتز cDNA به مدت 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. **Real Time PCR**: پس از استخراج سنتز cDNA نمونه‌های کشت بدون تیمار با سیلیبیین به عنوان کنترل و تیمار داده شده با سیلیبیین با استفاده از تکنیک Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction)، برای تعیین درصد تغییرات بیان ژنی *P53* استفاده شدند. از این رو بررسی میزان بیان ژن *P53* در قیاس با ژن *GAPDH* (ژن کنترل خانه دار) در همان نمونه‌ها به صورت بیان نسبی *P53* تخمین زده شد. بیان ژن‌ها در فرایند Real Time PCR به صورت سه‌گانه (Triplicate) انجام گردید. پرایمرهای طراحی شده برای هر ژن از نظر اختصاصی بودن با استفاده از BLAST در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) کنترل شد (جدول 1).

جدول 1. توالی‌های آغازگر استفاده شده

ژن	توالی	س
GAPDH	F: 5' AAG CTC ATT TCC TGG TAT GAC AAC G 3'	59
	R: 5' TCT TCC TCT TGT GCT CTT GCT GG 3'	
P53	F: 5' ATG TGC TGT GAC TGC TTG TAG ATG 3'	59
	R: 5' TCA ACA AGA TGT TTT GCC AAC TG 3'	

واکنش Real-Time PCR با استفاده از Master Mix 2x (Biorad، آمریکا) در حجم نهایی 20 میکرولیتر توسط دستگاه Real Time PCR (Biosystems Applied، آمریکا) انجام شد و آنالیز داده‌های سیکل آستانه (CT) توسط نرم افزار System software ver.2.0 انجام پذیرفت. برای تخمین درصد تغییرات (Fold change) بیان ژنی *P53* از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد که در آن $\Delta\Delta CT$ تفاوت سیکل آستانه ژن *P53* در قیاس با ژن کنترل *GAPDH* در بین نمونه کنترل (بدون تیمار با دارو) نسبت به نمونه تیمار شده با سیلیبیین تعیین گردید. در نهایت برای تخمین $2^{-\Delta\Delta CT}$ از نرم افزار اکسل ویرایش 2013 استفاده شد. **آنالیز آماری**: آنالیزهای آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت. مقایسه واریانس بین گروهی توسط آزمون ANOVA یک طرفه بین غلظت‌ها و آزمون t بین زمان‌بندی‌ها در هر غلظت انجام شد. یافته‌ها با $P < 0/05$ به عنوان معنی‌داری تلقی شد.

PBS (Phosphate Buffer Saline)؛ پتاسیم بیس فسفات و دی سدیم بیس فسفات) حل شده و در دستگاه الیزا مورد سنجش در طول موج 590 نانومتر قرار گرفت. غلظتی از سیلیبیین که قادر به مهار تقسیم سلولی به میزان 50 درصد باشد را با مؤلفه کینتیکی IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) نشان داده شد (نمودار 1).

فلوسایتومتری و بررسی آپوپتوز: در پلیت 6 خانه ای در هر چاهک به طور متوسط 5×10^4 سلول مورد تیمار قرار گرفتند. ظرف کشت حاوی 6 چاهک بوده غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم در لیتر برای 48 ساعت جهت بررسی آپوپتوز استفاده شد. سلول‌ها را پس از شستشو با PBS و یک واحد آنزیم تریپسین (Invitrogen، آمریکا) از پلیت جدا نموده و سانتریفوژ شدند. سلول‌ها با محلول 10 درصد بافر باندینگ (Ebioscience، آمریکا) شستشو داده شده و 15 دقیقه در 15000rpm سانتریفوژ شدند. محلول FITS (Fluorescein isothiocyanate) متصل به Annexin-V (Ebioscience، آمریکا) به میزان 5 میکرولیتر به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند. رنگ Annexin به فسفاتیدیل سرین‌های موجود در غشای سلول آپوپتوز یافته چسبیده و آنها را نشان‌دار می‌نماید. سپس با استفاده از 5 میکرولیتر محلول PI (Propidium iodide؛ Ebioscience، آمریکا) آماده شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur، آمریکا) شمارش سلولی در واحد 10^4 صورت گرفت. PI (Propidium iodide) در سلول‌های نکروز شده به DNA هسته متصل شده و تعداد سلول‌های نکروز شده را نشان داد. در این آزمون محیط کشت فاقد سیلیبیین به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: بعد از کشت سلولی و تیمار سلول‌ها، با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناژن، ایران) استخراج RNA طبق دستور شرکت سازنده انجام پذیرفت. برای جداسازی RNA از کلروفورم و ایزوپروپانول و شستشوی آن از اتانول 75% استفاده شد. در نهایت آلودگی‌های DNA با استفاده از تیمار RNase-free، DNase از بین برده می‌شود. از دستگاه نانو دراپ برای اندازه‌گیری RNA و سنجش خلصت و اندازه RNAها در طول موج‌های 280/260 و 280/230 نانومتر استفاده شد. به وسیله کیت سنتز cDNA (Vivantis، آمریکا) و پیرو دستورالعمل شرکت سازنده و با اضافه کردن

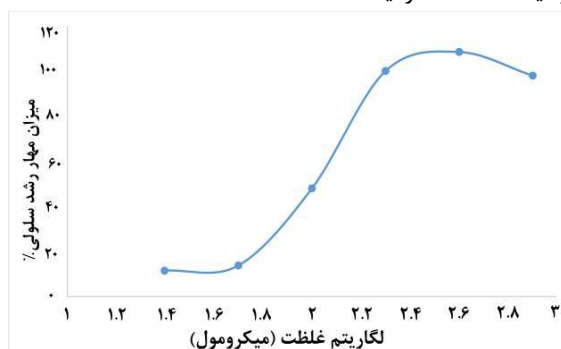
• یافته‌ها

ساعت بعد از تیمار تفاوت چشم گیری (141 میکرومول) با 48 ساعت نشان نداد (جدول 2).

جدول 2. مهار وابسته به زمان سیلیبیین بر بقاء سلولی و ارتباط آن با میزان IC_{50}

زمان (ساعت)	کنترل	غلظت سیلیبیین (μM)					IC_{50} (μM)
		50	100	200	400	DMSO	
24	0	0.0	0.0	52.0	86.2	92.5	199
48	0	10.7	28.5	78.5	92.2	92.5	158
72	0	7.7	42.0	86.8	94.0	92.5	141

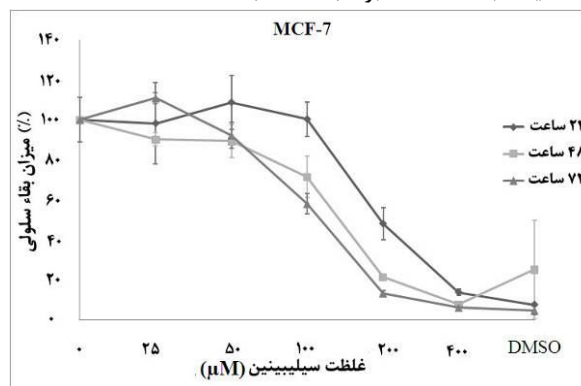
روند وابسته به زمان تأثیر سیلیبیین بر تقسیم سلولی در نمودار 1 نشان داده شده است. روند مهار رشد یا تقسیم سلولی بر اثر تأثیر غلظت‌های 50 الی 200 میکرومول در مقایسه با گروه کنترل در 48 و 72 ساعت نزدیک به هم و بیشتر از 24 ساعت پس از تیمار بود (نمودار 1). در کل یافته‌ها نشان دادند تأثیر مهارکنندگی سیلیبیین بر رشد سلولی وابسته به زمان و غلظت است. در تیمار با غلظت‌های 400 و 800 میکرومول مهارکنندگی رشد سلولی و میزان سمیت دارو مشابه با DMSO کنترل بود که این دو غلظت در ادامه آزمایشات حذف گردید.



نمودار 2. منحنی لگاریتم غلظت به منظور بررسی میزان IC_{50} و درصد مهار رشد سلولی سیلیبیین در غلظت‌های 25، 100، 200، 400 و 800 میکرومول که منجر به کاهش پروليفراتیو سلولی می‌شود (به روش MTT و در 24 ساعت)

تأثیر سیلیبیین بر میزان بروز آپوپتوز: تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیبیین در رده MCF-7 بر میزان بروز آپوپتوز و نکروز سلولی 48 ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری و در نمودار میله‌ای نشان داده شده‌اند (نمودار 3).

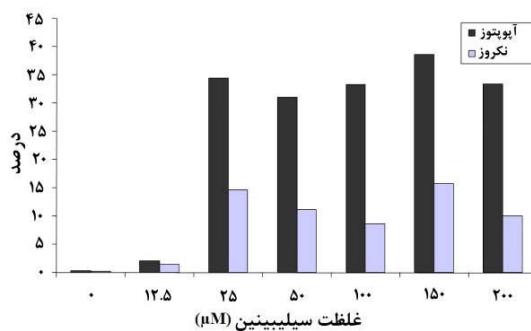
تأثیر سیلیبیین بر مهار رشد و تقسیم سلولی: اثر سیلیبیین بر میزان رشد سلول در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار 1). غلظت 200 میکرومول از سیلیبیین در زمان بندی 24 ساعت پس از تیمار در مقایسه با کنترل تیمار نیافته با سیلیبیین، به طور قابل توجهی از رشد سلولی جلوگیری نموده است ($P < 0/01$) (نمودار 1). نمودار 1 تفاوت نسبی بقاء سلولی را در زمان بندی‌های 3 گانه برای هر غلظت سیلیبیین (200، 100، 50 میکرومول) را به همراه کنترل بدون تیمار با سیلیبیین و DMSO نشان داده است. حداکثر میزان مهار رشد سلولی با کمترین میزان سمیت بر اساس تأثیر مهارکنندگی در 48 ساعت بعد از تیمار و در غلظت 100 میکرومول مشاهده گردید (نمودار 1). اختلاف آماری در میزان مهار رشد سلول در غلظت 50 میکرومول در 72 ساعت پس از تیمار در مقایسه با سایر غلظت‌های مطالعه مشاهده شد ($P < 0/05$). در غلظت 50 میکرومول سیلیبیین در زمان بندی 72 ساعت پس از تیمار مهار رشد سلول قابل مقایسه با 24 ساعت بود ($P < 0/05$).



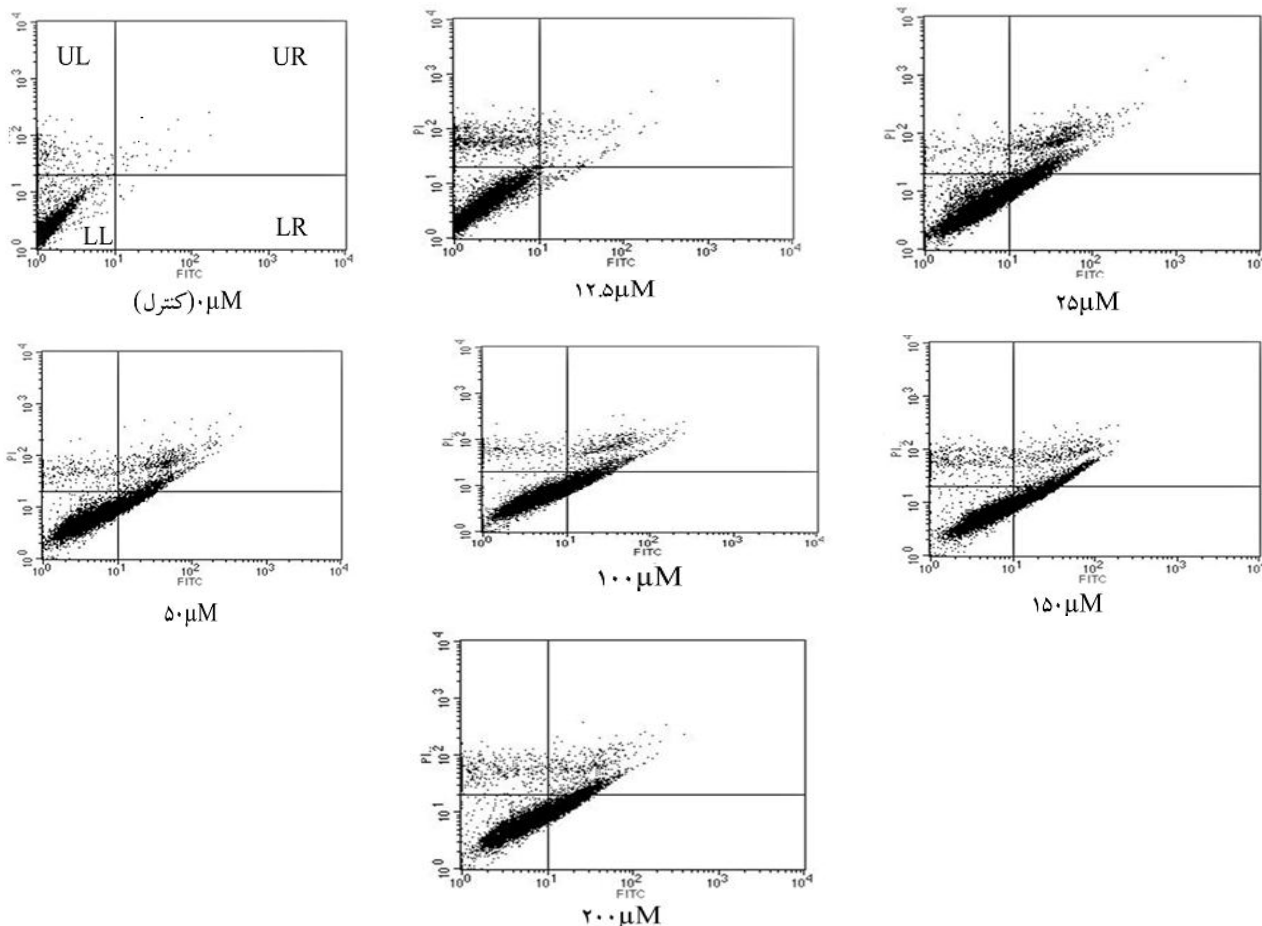
نمودار 1. مقایسه تأثیر غلظت دارو بر میزان بقاء سلولی در زمانهای مختلف تیمار سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل مثبت (DMSO) و منفی (بدون تیمار)

مهار وابسته به غلظت رشد سلولی توسط سیلیبیین از نظر میزان IC_{50} در زمان بندی سه گانه مورد بررسی قرار گرفت که به طور خلاصه در جدول 2 ارائه شده‌اند. میزان IC_{50} در مهار رشد سلولی در زمان 24 ساعت پس از تیمار به مقدار 199 میکرومول تخمین زده شد. این مؤلفه در زمان‌های طولانی‌تر تیمار (48 ساعت) کمتر شده و در غلظت کمتر از 158 میکرومول مشاهده گردید. میزان IC_{50} در زمان بندی 72

میزان بروز آپوپتوزیس در غلظت‌های 25 تا 200 میکرومول نزدیک بهم بوده و بیش از 30 درصد عامل آپوپتوز بوده و در غلظت 150 میکرومول که در محدوده IC₅₀ زمان 48 ساعت بوده بیشترین میزان (40 درصد) بروز آپوپتوز مشاهده شد. گروه کنترل منفی نیز شامل 93/6 درصد سلول‌های زنده بود. همچنین دارو در غلظت 12/5 میکرومول تأثیر معنی‌داری نداشت. مقادیر فراوانی نسبی نکروز و آپوپتوز در محیط کشت در مواجهه با هر غلظت سیلیبینین با استفاده از فلوسایتومتریک به روش Annexin-V نشان داد که میزان پدیده آپوپتوز در غلظت‌های استفاده شده در قیاس با نکروز عامل اصلی در مهار بقاء سلولی بود (شکل 1).

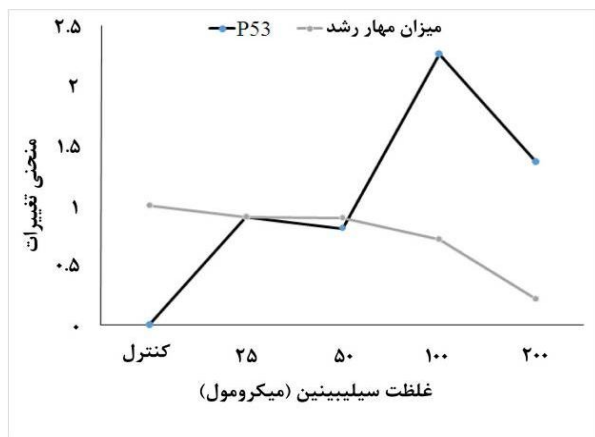


نمودار 3. نمودار توصیفی مقایسه بروز نکروز و آپوپتوز بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵ و گروه کنترل



شکل 1. داده‌های فلوسایتومتریک که نشان از القا آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده دارد.

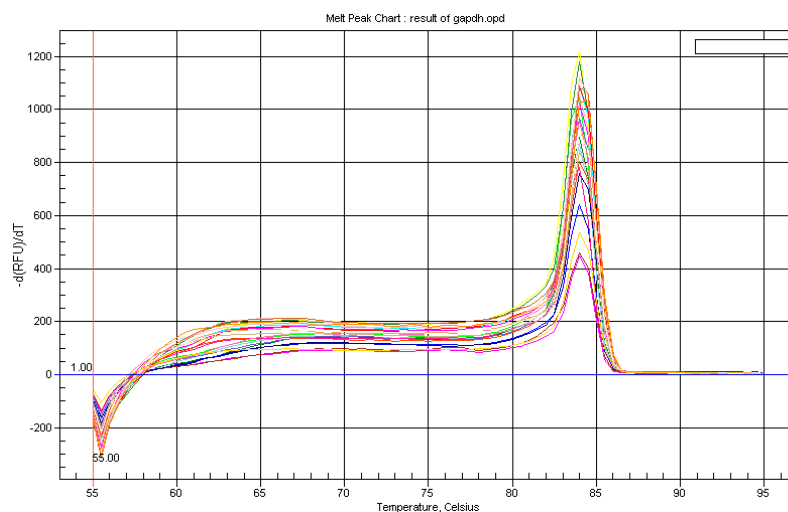
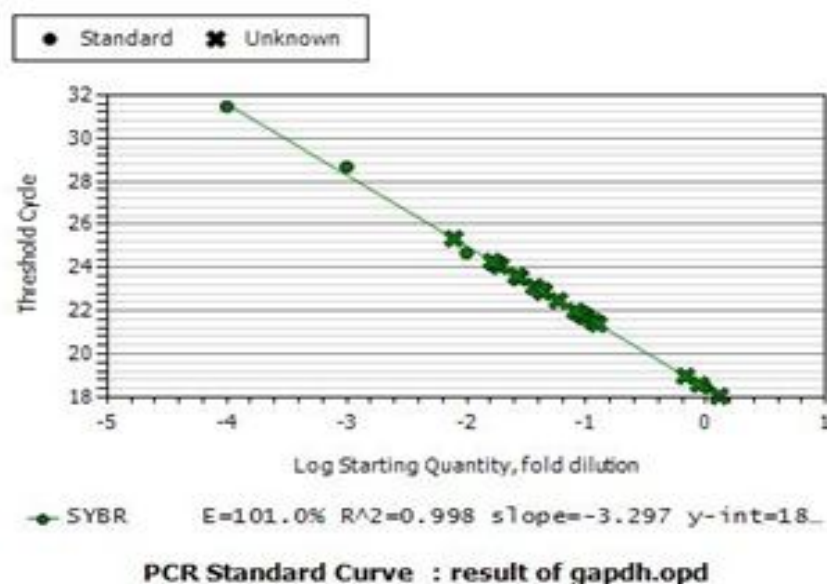
- LL: جمعیت سلول‌های زنده (AnnexinV - /PI -)
- LR: جمعیت سلول‌های با آپوپتوز اولیه (AnnexinV + /PI -)
- UL: جمعیت سلول‌های با نکروز تاخیری (نهایی) (AnnexinV - /PI +)
- UR: جمعیت سلول‌های با آپوپتوز تاخیری (نهایی) و نکروز اولیه (AnnexinV + /PI +)



نمودار 4. تغییرات سطوح بیان ژنی P53 در مقایسه با میزان تغییرات مهار رشد سلولی در پاسخ به دزهای مختلف دارو

تأثیر سیلیبیین بر بیان ژن P53: منحنی‌های استاندارد که از تکثیر غلظت‌های مختلف سیلیبیین با استفاده از آغازگرها رسم شده، نشان دهنده شیب منحنی یکسان با کارایی PCR در حدود 101% برای ژن GAPDH بود (شکل 2الف). منحنی ذوب نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن مورد نظر با استفاده از آغازگر مورد استفاده در مطالعه بود (شکل 2ب).

بیان ژن P53 در غلظت 100 میکرومول سیلیبیین در مقایسه با کنترل و غلظت 25 میکرومول دو برابر شده است (نمودار 4). ارتباط معکوس تغییرات میزان بیان ژنی در مقایسه با میزان بقاء سلولی نشان از تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیبیین بر بیان ژنی P53 و به تبع تشدید القای آپوپتوز دارد (نمودار 4).



شکل 2الف. منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف تیمار شده در رده سلولی MCF-7 با استفاده از آغازگر اختصاصی برای ژن GAPDH ب. منحنی ذوب محصول PCR تکثیر شده با آغازگر P53 مورد استفاده در مطالعه

• بحث

غلظت‌های 400 و 800 میکرو مولار همانند با گروه کنترل DMSO اثر سمی به سزایی بر سلول‌ها داشتند. مطالعات نشان داده‌اند سیلیبینین اثر آپوپتوتیک و ضد رشد قوی بر روی رده‌های سلولی مختلف دارد (24). Wang و همکاران اثر ضد التهابی و القای آپوپتوز توسط سیلیبینین را در ارتباط با افزایش بیان ژنی *Bcl-2* (آنتی آپوپتوتیک) و کاهش بیان *Bax* (آپوپتوتیک) در سلول‌های مغزی بعد از سکتة نشان دادند (25). Tyagi و همکاران اثر سیلیبینین را روی سلول‌های سرطانی بیضه با محوری بودن افزایش بیان *P53* متأثر از تیمار با سیلیبینین مطرح نموده و فعال شدن پروتئین کاسپاز 2 افزایش بیان ژنی *Bid* را نشان دادند (26). در مطالعه حاضر نیز سیلیبینین باعث افزایش بیان ژن *P53* شد، به طوری که در مقایسه با میزان بقاء سلولی رابطه عکس مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر نیز سیلیبینین باعث فعال شدن مسیر آپوپتوز در رده *Hep55* شد (27). Wang و همکاران نشان دادند که سیلیبینین باعث محافظت از سلول‌های درمال و اپی درمال در برابر پرتو فرا بنفش به وسیله افزایش بیان ژن *P53* شده و اثر ضد سرطانی و ضد تومورزایی دارد (28). در مطالعه حاضر اگرچه غلظت 12/5 میکرومول سیلیبینین تأثیر قابل توجه و معنی‌داری نداشته ولی با افزایش غلظت‌ها میزان بروز آپوپتوز تشدید شد. تغییرات و میزان بروز آپوپتوز در مقایسه با نکرز معنی‌دار می‌باشد. در مطالعه حاضر با بررسی فلوسایتومتریک با رنگ آمیزی *Annexin-V* بروی سلول‌های تیمار شده با سیلیبینین، بروز آپوپتوز و ورود سلول‌ها به فاز آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار با سیلیبینین) نشان داده شد که دلیل عمده مرگ سلولی و مهار رشد در غلظت‌های پیش‌بینی شده به علت بروز آپوپتوز بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان دهنده ارتباط مستقیم غلظت دارو با افزایش بیان ژن *P53* بود. این آزمایش تأیید می‌کند که اثر سمی سیلیبینین باعث ورود سلول‌ها به فاز آپوپتوز و بیان ژن آپوپتوتیک *P53* شده و در مقایسه با غلظت و میزان بقا و رشد سلولی با افزایش غلظت باعث افزایش مرگ سلولی و همچنین افزایش بیان ژن *P53* می‌شود که نشان از تأثیر سیلیبینین بر این ژن و فرایندهای مرتبط در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده کنترل دارد. برای تعیین مکانیسم دقیق‌تر مولکولی باید مطالعات بیشتر صورت پذیرد.

یافته‌های حاضر نشان دادند سیلیبینین اثر مهاری بالقوه بر سلول‌های MCF-7 داشت که باعث کاهش رشد سلول و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شد. تأثیر مهاری سیلیبینین به صورت وابسته به تغییر زمان و وابسته به غلظت بود. در این مطالعه، سیلیبینین در غلظت‌های بالای 25 میکرومول باعث مهار رشد و افزونی پیدایش آپوتوز در رده سلولی MCF-7 شد. مطالعه Ghasemi و همکاران نشان داد، سیلیبینین در رده سلول‌های کبدی (*HepG2*) و *Hep3B*) اثر سمی بسیار قوی دارد که باعث بروز آپوپتوز سلول شد (9). در مطالعه‌ای همسو با یافته‌های مطالعه حاضر سیلیبینین همراه با اشعه فرا بنفش در رده سلولی MCF-7 اثر مهاری رشد سلولی داشت ولی سازوکار و مکانیسم مولکولی اثر آن بررسی نشده است (20). در مطالعه محمودی و همکاران تأثیرات سیلیبینین در رده سلولی T47D در مهار رشد و افزایش مرگ سلولی نشان داده شده است (21). همانند یافته‌های مطالعه حاضر، Nejadi و همکاران در مطالعه‌ای روی رده سلولی T47D نشان دادند که افزایش زمان از 24 به 48 ساعت در کاهش میزان IC_{50} از 109 به 31 میکرومول مؤثر است (22). این پدیده نشانگر افزایش کیفیت تأثیر سیلیبینین دارد. مطالعه‌ای با نتایج همسو نشان داده است که سیلیبینین تأثیرات وابسته به زمان در سلول‌های سرطان کولون دارد (23). همسو با یافته‌های این بررسی، Nejadi و همکاران با معرفی دزهای مختلف از صفر تا 200 میکرومول سیلیبینین شاهد افزایش القای آپوپتوز سلول‌ها در رده سلول‌های سرطان پستان بودند (22). از جمله اهداف این طرح بررسی تأثیر غلظت بر سلول‌ها بود که با بررسی غلظت‌های صفر تا 800 میکرومول موجب افزایش میزان مرگ سلولی همراه با افزایش غلظت آنها شد. همچنین در نسبت مقایسه غلظت‌های 50، 100 و 200 شاهد کاهش معنی‌دار بقای سلولی به نسبت گروه کنترل بودیم. در مطالعه حاضر غلظت‌های 400 و 800 میکرومول اثرات سمی بسیار قوی مشابه کنترل DMSO بود که پیش‌بینی غلظت دارویی سیلیبینین را در شرایط آزمایشگاهی *in vitro* ممکن می‌سازد. یافته‌های حاضر نشان دادند که سیلیبینین به عنوان یک مهار کننده رشد سلولی در رده سلولی MCF-7 در غلظت‌های زیر 200 میکرو مولار مؤثرتر بر بقا و رشد سلولی با سمیت پایین تر بود. این در حالی است که

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب شعبه بین الملل ارس بوده و مراحل اجرایی آن توسط مرکز تحقیقات کاربردی-دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تأمین مالی شد. مراحل اجرایی طرح در آزمایشگاه‌های دانشکده علوم نوین پزشکی و مرکز تحقیقات نانو فناوری دارویی صورت گرفت. لذا از مسئولین مراکز یاد شده تشکر و قدردانی می‌گردد.

بطور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که سیلیبینین وابسته به زمان و غلظت باعث مهار رشد، افزایش مرگ سلولی، تشدید بروز آپوپتوز و بیان ژن *P53* در سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 می‌شود. این داده‌ها ضمن تأیید یافته‌های پیشین شواهدی مبنی بر تأثیر سیلیبینین به عنوان یک عامل Chemopreventive اثر بخش با تأثیر آپوپتوتیک پیشنهاد کرده است. پژوهش‌های تکمیلی در سطوح سلولی جهت یافتن مکانیسم فلانولینگان در ابعاد مولکولی و انجام مطالعات کارآزمایی بالینی جهت تأیید اثربخشی این ترکیب در درمان سرطان پیشنهاد می‌گردد.

References

- Hajian K FA, Kia MT. Pattern of age distribution of different cancers in Babol in 2001. *Pajouhesh Dar Pezeshki*. 2003;27 (3):6.[in persian]
- Samadi N, Gaetano C, Goping I, Brindley D. Autotaxin protects MCF-7 breast cancer and MDA-MB-435 melanoma cells against Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*. 2008;28(7):1028-39.
- Shahbazi R, Davoodi H, Esmaeili S. The anticancer effects of flavonoids: involvement of PI3K/Akt signaling pathway. *Iranian Jour of Nut Sci & Food Tech*. 2013;7(4, Suppl.):Pe1-Pe9, EnS10.
- Sabzichi M, Hamishehkar H, Ramezani F, Sharifi S, Tabasinezhad M, Pirouzpanah M, et al. Luteolin-loaded Phytosomes Sensitize Human Breast Carcinoma MDA-MB 231 Cells to Doxorubicin by Suppressing Nrf2 Mediated Signalling. *APJCP*. 2014;15(13):5311.
- Easton J, Houghton P. mTOR and cancer therapy. *Oncogene*. 2006;25(48):6436-46.
- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol nut & food res* 2008;52(5):507-26.
- Maleksabet A, Dehghani S, Amiri SRM, Nazemiyeh H, Samadi N. Anti-proliferative Effects of Fenugreek extract on Human Breast Cancer Cells. *Scientia Guaianae*. 2014;5(3):50-7.
- Kauntz H, Bousserouel S, Gosse F, Marescaux J, Raul F. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Inte jour of oncology*. 2012;41(3):849-54.
- Ghasemi R, Ghaffari SH, Momeny M, Pirouzpanah S, Yousefi M, Malehmir M, et al. Multitargeting and antimetastatic potentials of silibinin in human HepG-2 and PLC/PRF/5 hepatoma cells. *Nut and cancer*. 2013;65(4):590-9.
- Lin CJ, Sukarieh R, Pelletier J. Silibinin inhibits translation initiation: implications for anticancer therapy. *Mol cancer therapeutics*. 2009;8(6):1606-12.
- Park D, Dilda PJ. Mitochondria as targets in angiogenesis inhibition. *Mol aspects of med*. 2010;31(1):113-31.
- Sadava D, Kane SE. Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer letters*. 2013;339(1):102-6.
- Zheng D, Wang Y, Zhang D, Liu Z, Duan C, Jia L, et al. In vitro antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. *Cancer letters*. 2011;307(2):158-64.
- Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Cli cancer res : An official jour of the AAfor Cancer Res*. 2005;11(23):8441-8.
- Kauntz H, Bousserouel S, Gosse F, Raul F. Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived metastatic cells. *Apoptosis*. 2011;16(10):1042-53.
- Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *Jour of the Natil Cancer Inst*. 2006;98(12):846-55.
- Yousefi M, Ghaffari SH, Soltani BM, Nafissi S, Momeny M, Zekri A, et al. Therapeutic efficacy of silibinin on human neuroblastoma cells: Akt and NF-kappaB expressions may play an important role in silibinin-induced response. *Neurochemical res*. 2012;37(9):2053-63.
- Tiwari P, Kumar A, Balakrishnan S, Kushwaha H, Mishra K. Silibinin-induced apoptosis in MCF7 and T47D human breast carcinoma cells involves caspase-8 activation and mitochondrial pathway. *Cancer investigation*. 2011;29(1):12-20.
- Pesakhov S, Khanin M, Studzinski GP, Danilenko M. Distinct combinatorial effects of the plant polyphenols curcumin, carnosic acid, and silibinin on proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Nut and cancer*. 2010;62(6):811-24.

20. Noh EM, Yi MS, Youn HJ, Lee BK, Lee YR, Han JH, et al. Silibinin enhances ultraviolet B-induced apoptosis in mcf-7 human breast cancer cells. *Jour of BC*. 2011;14(1):8-13.
21. Mahmoodi N, Motamed N, Paylakhi SH. The Comparision of Silybin and Silybin-Phosphatidylcholine Effects on Viability, ESR1 and ESR2 Expression in Human Breast Cancer T47D Cell line. *Cell Jour*. 2014.16(3):9-11
22. Nejati-Koshki K, Zarghami N, Pourhassan-Moghaddam M, Rahmati-Yamchi M, Mollazade M, Nasiri M, et al. Inhibition of leptin gene expression and secretion by silibinin: possible role of estrogen receptors. *Cytotechnology*. 2012;64(6):719-26.
23. Akhtar R, Ali M, Mahmood S, Sanyal SN. Anti-proliferative action of silibinin on human colon adenomatous cancer HT-29 cells. *Nut hospitalaria*. 2014;29(2):388-92.
24. Singh RP, Agarwal R. A cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer. *Muta res*. 2004;555(1-2):21-32.
25. Wang C, Wang Z, Zhang X, Zhang X, Dong L, Xing Y, et al. Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: Up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1 α and Bcl-2, down-regulated Bax, NF- κ B expression. *Neuroscience letters*. 2012;529(1):45-50.
26. Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis*. 2006;27(11):2269-80.
27. Becker M, Schmezer P, Breuer R, Haas S, Essers M, Krammer P, et al. The traditional Chinese medical compound Rocaglamide protects nonmalignant primary cells from DNA damage-induced toxicity by inhibition of p53 expression. *Cell death & disease*. 2014;5(1):e1000.
28. Wang Q, Liu W, Zeng H, Xie X, Zang G, Ye Y, et al. p53-mediated autophagy adjustment is involved in the protection of silibinin against murine dermal inflammation and epidermal apoptosis induced by UVB irradiation. *Jour of Asian nat pro res*. 2013;15(2):117-29.

The Effects of Silibinin on the Induction of Apoptosis and Inhibition of Cell Growth in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Pirouzpanah MB¹, Pirouzpanah S², Sabzichi M³, Pashaei-Asl R⁴, Pashaei-Asl M⁵, Samadi N^{6*}

1. M.Sc Student in Biochemistry and Clinical Laboratories, Students` Research Committee, International Branch of Tabriz University for Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Assistant Prof, Dept. of Biochemistry and Dietetics, School of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. M.Sc in Pharmaceutical Technology Laboratory, and Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. M.Sc in Biochemistry, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University for Medical Sciences, Tabriz, Iran
5. Assistant Prof, Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University for Medical Sciences, Tabriz, Iran
6. *Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Biochemistry and Clinical Laboratories, Faculty of Medicine, Tabriz University for Medical Sciences, Tabriz, Iran, E-mail: drnsamadi@yahoo.com

Received 1 Jun, 2014

Accepted 2 Sept, 2014

Background and Objectives: Breast cancer is one of the most common leading causes of cancer-related mortality in women. Silibinin, a natural flavonolignane and the main component of milk thistle (*Silybum maianum*), has conventionally been overlooked as anti-hepatotoxic and anti-cancer agent. In this study, we assessed the effects of Silibinin on breast cancer cell viability, growth, apoptosis and expression level of *P53* gene in MCF-7 cells.

Materials and Methods: The MCF-7 cells were treated in the medium of RPMI1640 and silibinin (control and 25–800 μ M) for 24, 48 and 72 hours. Cell proliferation was assessed by MTT (Methyl-Thiazol-Tetrazolium) assay. The percentage of apoptosis was determined by flow cytometry analysis using Annexin-V fluorescein isothiocyanate (FITC). The fold changes of *P53* expression were determined by Real-Time PCR.

Results: The results showed the maximum inhibitory effect of silibinin on the inhibition of cell growth and induction of apoptosis at a concentration of 200 μ M after 24 hour incubation ($p < 0.05$). Incubation of the cells with silibinin for 48 hours descended IC_{50} value to 148 μ M ($p < 0.05$). The flowcytometric analysis showed that silibinin-induced apoptosis is independent of its cytotoxic effects on the cells. Increase in the percentage of apoptosis was associated with significant increase in *P53* mRNA level.

Conclusions: Silibinin inhibited cell growth and induced apoptosis in a time-dose depending effect. Furthermore, Silibinin treatment resulted in apoptotic effects on MCF-7 cells. These results suggested that Silibinin could be an affective component to induce cell cycle arrest and apoptosis *in vitro*.

Keywords: Silibinin, Apoptosis, Cell growth, Breast cancer, *P53*