

Anti-Cancer Effect of Silibinin on Epithelial Ovarian Cancer Cell Line and P21 Gene Expression

Pashaei-Asl F^{1,2}, Pashaiasl M^{3,4*}

1. Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Genetics, East Azarbaijan Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

4. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author. Tel: +989362448791 Fax: +984133342086 E-mail: pashaim@tbzmed.ac.ir

Received: Feb 09, 2016

Accepted: Jul 27, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: Epithelial ovarian carcinoma seems to be one of the most lethal cancer types among all gynecological malignancies. The conventional course of therapy includes chemotherapy. Actually most cancers respond to chemotherapy but in the long run drug resistance and side effects cause treatment failure. In addition, milk thistle (silibinin), a plant that has been used from ancient time because of its good effects on different organs, determined to have powerful antioxidant activity. The aim of this study was to examine the effect of silibinin on SKOV-3 cancer cell line after 48 hours of treatment and P21 gene expression which involves in cell cycle progression.

Methods: The human epithelial ovarian cancer cell line SKOV-3 was cultured as monolayer in 25 cm² flask in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Then the numbers of live cells were calculated using hemocytometer method and the cells were seeded in 96-well flat-bottomed culture plates and treated with different concentration of Silibinin. MTT assay was carried out to determine cell viability. To study P21 gene expression, RNA extraction and cDNA synthesis were carried out and real-time PCR was done.

Results: Cell growth was inhibited considerably by Silibinin treated groups compared with control after 48 hours. P21 gene expression was increased as well.

Conclusions: According to the results, Silibinin can be used as an effective drug in cancer treatment. More studies on animal models are also suggested.

Keywords: Silibinin; P21; Ovarian Cancer Cell; Gene Expression.

اثر ضد سرطانی سیلیبینین بر روی رده سلولی سرطان اپیتیلیالی تخدمان و بررسی بیان ژن P21

فاطمه پاشائی اصل^{۱،۲}، مریم پاشائی اصل^{۳،۴*}

۱. گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران ۲. گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران ۳. مرکز تحقیقات سلامت باوری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۴. گروه علوم تشریعی و بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۳۶۲۴۴۸۷۹۱. فکس: ۰۴۱۳۶۵۷۶۸۸۸. ایمیل: pashaim@tbzmed.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرطان تخدمان یکی از کشنده‌ترین سرطان‌های زنان می‌باشد و نوع اپیتیلیالی آن، شایع‌ترین فرم تومورهای بدخیم تخدمان را شامل می‌شود. از جمله درمان‌های مرسوم، استفاده از شیمی درمانی می‌باشد، اما با استفاده متداول از این روش درمانی، عوارض جانبی و مقاومت دارویی نیز مشاهده می‌شود که موجب عدم پاسخ مناسب به درمان می‌باشد. سیلیبینین ماده موثره گیاه خار مریم (Milk thistle)، ترکیب گیاهی است که از دیرباز به دلیل آثار مفید آن بر روی اندام‌های مختلف انسان مورد استفاده قرار می‌گرفت و اخیراً نیز اثر ضدسرطانی آن به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر سیلیبینین ۴۸ ساعت پس از تیمار بر روی رده سلولی SKOV-3 سرطان تخدمان و بررسی بیان ژن P21، که دخیل در پیشرفت چرخه سلولی می‌باشد.

روش کار: رده سلولی SKOV-3 سرطان اپیتیلیالی تخدمان انسانی، بصورت تک لایه داخل فلاسک‌های cm^2 ۲۵ در محیط RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند، سلول‌های زنده به وسیله هموسایتومنتر شمارش شده، داخل پلیت‌های ۹۶ خانه ریخته شده و توسط غلظت‌های مختلف سیلیبینین تیمار شدند. روش MTT به منظور یافتن درصد زنده بودن سلول‌ها انجام یافت. به منظور بررسی بیان ژن P21 RNA آنها استخراج و c-DNA سنتز شده، نهایتاً real-time PCR انجام یافت.

یافته‌ها: رشد سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت تیمار با سیلیبینین در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار با دارو به طور قابل توجهی مهار شدند، همچنین افزایش بیان در ژن P21 مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، سیلیبینین به عنوان یک داروی مؤثر گیاهی در درمان سرطان مطرح می‌باشد و بررسی بر روی مدل حیوانی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیلیبینین، ۴۸p، سلول سرطان تخدمان، بیان ژن

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۶

مقدمه

سرطان‌های زنان محسوب می‌شود و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی که بیماری به مرحله پیشرفته رسیده است تشخیص داده شده و عمدهاً غیرقابل درمان می‌باشد [۱،۲]. انواع مختلفی از سرطان در تخدمان ممکن است بوجود آید ولی شایع‌ترین فرم تومورهای بدخیم تخدمانی از نوع اپیتیلیالی می‌باشد [۳،۴]. در

سرطانی سیلیبینین بخصوص در سرطان‌های اپیتیالی مانند پوست، پروستات و ریه روشن شده است [۱۵، ۱۶]. اثرات ضدسرطانی، ایمن و غیر سمی سیلیبینین بر روی برخی از سلول‌های انسانی بررسی شده است که در راستای اهداف آپوپتوزیک، ضد تقسیم سلولی، ضدرگزایی و متابولیسم سلول سرطانی می‌باشد ولی مکانیسم این اثرات کاملاً متفاوت، هنوز بررسی کامل نشده است [۱۶، ۱۷]. در مطالعه‌ای که بر روی رده Cdc42- MDA-MB-231 و بیان ژن ۱ Raf و سلولی Hep3B همچنین در رده سلولی HepG2 و Hep3B، سیلیبینین اثر سمی بسیار قوی داشته و باعث آپوپتوز سلول می‌شود [۱۹].

پیشرفت چرخه سلولی توسط یک سری از سایکلین‌ها و کینازهای وابسته به سایکلین اداره می‌شود که این سایکلین‌ها به وسیله اتصال و فعال کردن کینازهای وابسته به سایکلین مربوطه عمل می‌کنند [۲۰، ۲۱]. P21 بازدارنده کاینیز وابسته به سایکلین قوی^۲ (CKI) -CDK2-cyclin- می‌باشد، پروتئین P21 به کمپلکس CDK1 و همچنین CDK4/6- متصل شده و آن را مهار می‌کند، در نتیجه عملکرد آن به عنوان یک تنظیم کننده در پیشرفت چرخه سلولی از فاز G1 به S^۳ می‌باشد [۲۲]. بیان این ژن شدیداً توسط پروتئین سرکوبگر p53 کنترل می‌شود [۲۳]. در این مطالعه بیان ژن p21 بعنوان یک پروتئین دخیل در چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر ضد سرطانی سیلیبینین در مدت زمان ۸ ساعت پس از تیمار بر روی رده سلولی سرطان اپیتیالی تخدمان و بررسی بیان ژن P21 می‌باشد. شناسایی تاثیر این دارو در رده سلولی سرطانی تخدمان می‌تواند دید بهتری نسبت به تدوین و اجرای پروتکل‌های درمانی در اختیار قرار دهد.

² Cyclin Kinase Inhibitor

³ GAP 1 Phase to Synthesis Phase

مطالعه‌ای، میزان ابتلا به نوع اپیتیالی سرطان تخدمان را بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های تخدمان بیان کرده است که ناشی از سلول‌های اپیتیالی پوشاننده سطح تخدمان می‌باشد [۷]. از جمله عوامل خطر که ممکن است احتمال سرطان را در زنان بالاتر ببرد می‌توان به افزایش سن در زنان اشاره کرد، به طوری که پس از بائسگی احتمال ابتلا به سرطان‌های زنان و از جمله آنها سرطان تخدمان افزایش می‌یابد [۸]. اگر چه بسیاری از تکنیک‌های جراحی و شیمی درمانی برای سرطان تخدمان توسعه یافته‌اند، اما به دلیل پیش آگهی ضعیف، میزان بقاء در هر سال به حدود ۴۵ درصد تقلیل یافته است [۹]. پیش آگهی مطلوب تر در بیماران مبتلا به مرحله II/I تومور می‌باشد، اما اکثر بیماران در مرحله پیشرفته بیماری (IV/III) هستند [۱۰]. درمان مرسوم سرطان تخدمان شامل برداشتن توده توموری توسط جراحی به همراه شیمی درمانی کمکی می‌باشد [۵]. شیمی درمانی استفاده از داروهای خاصی است که رشد سلول‌های سرطانی را متوقف یا کند. این فرآیند درمانی بر روی تقسیم سلول‌هایی که رشد زیادی دارند (مانند سلول‌های سرطانی) تاثیر گذاشته و مانع از رشد آنها می‌شود. پکلی تاکسل و داروی سیس پلاتین از جمله داروهای شیمی درمانی هستند که در درمان سرطان تخدمان استفاده می‌شوند [۷]. پکلی تاکسل بصورت غیرکووالانسی به میکروتوبول متصل شده و باعث افزایش پایداری آنها شده و در تشکیل دوک میتوزی تداخل ایجاد می‌کند، هر دو دارو باعث القای آپوپتوز می‌شوند [۱۱، ۱۲، ۱۳]. شیمی درمانی معمولاً هر سه هفته یکبار تجویز می‌شود [۱۴]. با رواج شیمی درمانی، علی رغم اثرات مفید آن، اثرات سوء درمان نیز بارزتر شده است. امروزه بفرمودن از درمان‌های جایگزین امن تر و بی خطر مانند استفاده از داروهایی با منبع گیاهی برای درمان سرطان افزایش یافته است. سیلیبینین ماده موثره گیاه خار مریم^۱ با نام علمی *Silybum marianum* می‌باشد که اثرات ضد سرطانی آن مشاهده شده است [۱۵]. امروزه اثر ضد

¹ Milk Thistle

Merk آلمان) به عنوان حلال برای تهیه محلول پایه سیلیبینین با مولاریته ۴۸۲/۴۴ استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از این مرحله، محیط حاوی دارو دور ریخته شده و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT^۴ (Sigma آمریکا)، به همراه ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. نهایتاً محتوای چاهک‌ها بیرون ریخته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (بعنوان حلال) و ۲۵ میکرولیتر محلول بافر Sorensen's glycine (جهت توقف تأثیر MTT) اضافه گردید و توسط دستگاه الیزا ریدر، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج با مقایسه گروه کنترل (سلول‌های بدون تیمار) نرماییزه شدند. IC₅₀^۵ سیلیبینین (غلظتی از دارو که قادر به مهار رشد ۵ درصد سلول‌ها می‌باشد) بدست آمد و به این وسیله غلظت مناسب برای استفاده این دارو تعیین شد. لازم به ذکر است که تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار شده‌اند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

۴ ساعت پس از تیمار با دارو با غلظت ۲۵ میکرومولار و همچنین گروه کنترل بدون تیمار با دارو، محیط از روی سلول‌های تک لایه چسبیده به ته پلیت ۶ خانه بیرون ریخته شده و به وسیله ۱ میلی‌لیتر از RNAX-PLUS (Cinagene, Iran) سلول‌ها جمع شدند. RNA توتال توسط کیت سیناژن (RNX-Plus Solution, SinaClon, Iran) استخراج گردید. پس از سنجش کیفیت و اطمینان از عدم آلودگی و همچنین تعیین میزان غلظت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در OD ۲۶۰ و ۲۸۰ به وسیله دستگاه نانو دراپ (NanoDrop- ND-1000) سنجیده شد. سنتز cDNA توسط کیت سنتز (Thermo) صورت گرفت.

^۴ MethylThiazolTetrazolium

^۵ Half Maximal Inhibitory Concentration

روش کار

کشت سلولی

در این تحقیق به منظور بررسی اثر سیلیبینین، از رده سلولی سرطان SKOV-3 (انستیتو پاستور ایران) برای کشت سلولی استفاده شد. برای انجام این آزمایشات، سلول‌های SKOV-3 به صورت تک لایه در محیط RPMI-1640 (Gibco) در میلی لیتر آنتی بیوتیک پنیسیلین (Sigma آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم سرم FBS^۱ (Gibco آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپтомایسین (Sigma آمریکا) در دمای ۳۷°C در انکوباتور ۵٪ CO₂ دار و هوای مرطوب کشت داده شدند. پس از رسیدن به سطح تراکم بالای ۸۰ درصد، پاساژ انجام یافت؛ به این صورت که ابتدا محیط کشت سلول‌ها بیرون ریخته شده و با PBS^۲ شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک و از هم دیگر، تریپسین اضافه شد. پس از جدا شدن سلول‌ها، مقداری محیط کشت دارای FBS جهت خنثی کردن اثر تریپسین افزوده شده و بعد از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ rpm) به مدت ۵-۱۰ دقیقه، محیط دور ریخته شده و ۱ میلی لیتر محیط جدید اضافه شد. به منظور شمارش، ۵۰ میکرولیتر از محلول سلولی و ۵۰ میکرولیتر تریپسین بلو (رنگ حیاتی) داخل میکروتیوب ریخته سپس حدود ۱۰ میکرولیتر از محلول، روی لام نئوبار ریخته شد.

MTT assay

پس از شمارش، رقیق‌سازی سلول‌ها تا مقدار مشخص (۲۵۰۰ سلول) برای هر چاهک پلیت ۹۶ خانه انجام یافت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و هوای مرطوب CO₂ دار، محیط رویی دور ریخته شده و محیط حاوی دارو با غلظت‌های مشخص ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و نیز گروه کنترل فقط با محیط کشت، تیمار شدند. از DMSO^۳

^۱ Fetal Bovine Serum

^۲ Phosphate Buffer Saline

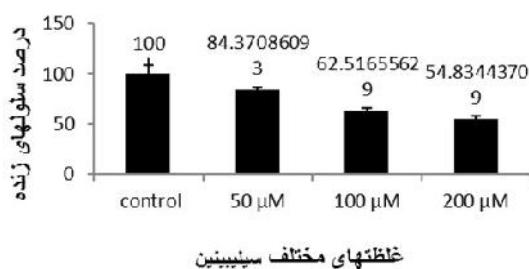
^۳ Dimethyl Sulfoxide

هر یک از آزمایشات به صورت دو بار تکرار انجام یافته و بیان نسبی ژن نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار، توسط روش Ct-2 محاسبه و نرمالیزه گردید.

Real time – PCR
برای بررسی بیان ژن P21 از سیستم Rotor-Gene (Corbett, UK) 6000 Real-time PCR و از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ برای همانندسازی ژن P21 و ژن -actin- بعنوان ژن خانگی استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌های مورد استفاده

ژن	توالی پرایمر ژن‌ها (5' to 3')
P21	'GCTTCATGCCAGCTACTTCC 3'F 5 'CCCTCAAAGTGCCATCTGT 3'R 5
-actin	'GGCACCCAGCACAATGAAGA 3'5 F 'CGACTGCTGTCACCTTCACC 3'R 5



نمودار ۱. سیلیبینین ۸ ساعت بعد از تیمار، محور عمودی درصد سلول‌های زنده و محور افقی غلظت دارو را نشان می‌دهد.

نتایج مورفولوژیک پس از تأثیر سیلیبینین

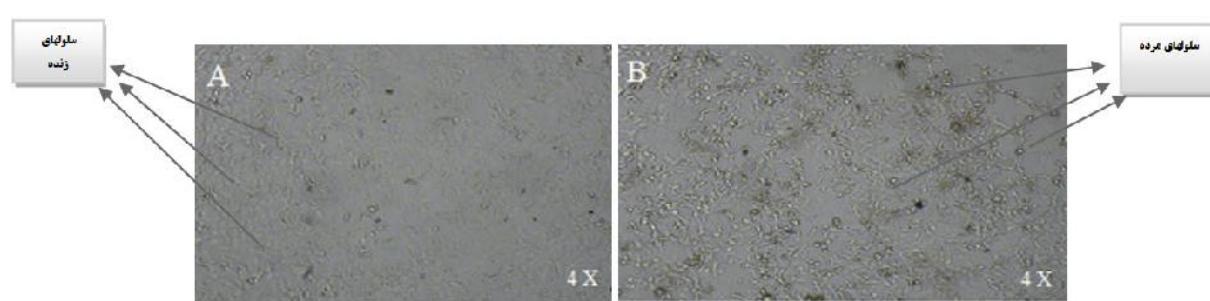
نتایج مورفولوژیک سلول‌های تیمارشده در پلیت ۶ خانه‌ای به منظور انجام Real- time PCR مشاهده می‌شود، بدین صورت که شکل سلول‌ها پس از مواجهه با دارو در مقایسه با گروه کنترل بدون دریافت دارو تغییر یافته است (شکل ۱).

آنالیز آماری

از نرم افزار Excel برای محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌ها استفاده شد و نمودار شاخص IC50 بدست آمد. نتایج مربوط به آنالیز Real time- PCR نیز توسط برنامه Rotor-Gene 6000 آنالیز شدند. یافته‌های حاصل به وسیله نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون T تحلیل شدند که بیانگر معنی‌داربودن مهار رشد سلول‌ها در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) می‌باشد ($p < 0.05$).

یافته‌ها

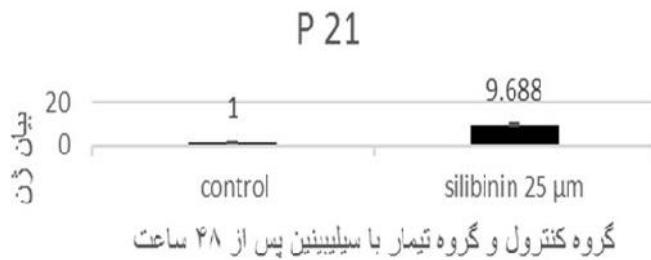
تأثیر سیلیبینین بر مهار رشد و تقسیم سلولی



شکل ۱. (A). سلول‌های رد skov-3 ۸ ساعت بعد از انکوباسیون بدون اثر دارو (کنترل). (B). سلول‌های رد skov-3 تیمار شده با سیلیبینین غلظت ۲۵ میکرومولار پس از ۸ ساعت انکوباسیون

از نرمالیزه شدن با ژن بتا اکتین و محاسبه به روش Relative Ct² به مقدار ۹/۶۸۸ برابر بصورت Expression برآورد شد (نمودار ۲).

نتایج Real Time – PCR: بررسی بیان ژن P21 بیان ژن P21 در گروه تیمارشده با غلظت مشخص کمتر از IC50 به دست آمده از نتایج MTT assay سیلیبینین نسبت به گروه کنترل بدون تیمار به صورت معنی داری افزایش نشان داد، این میزان پس



نمودار ۲. بررسی بیان ژن P21 در سلول‌های skov-3 تیمار شده با سیلیبینین در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار با دارو پس از ۴۸ ساعت

ترکیب جدید با منشأ کامل‌گیاهی و کم خطر، توجه محققین را بیش از پیش به خود جلب کرده است. سیلیبینین نوعی فلاونوئید (ترکیب فنولدار) است، فلاونوئیدها از جمله تنظیم‌کننده‌های فیزیولوژیکی محسوب می‌شوند که در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند؛ سیلیبینین ماده موثر گیاه خارمیریم می‌باشد که اثرات ضدسرطانی آن مشاهده شده است [۱۵]. این ماده به عنوان یک فلاونوئید ضدسرطان، با القاء آپاپتوز در انواع مختلف سرطان‌ها در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن با هدف قراردادن عوامل مختلف و مسیرهای مختلف

پیام رسانی از جمله Cip1/p21-Catenin, Bcl2, Kip1/p27, MAPK/ERK, STAT3, COX-2/PGE2 و VEGF و PI3K/AKT که معمولاً در انواع سرطان‌ها دچار اختلال عملکرد می‌شوند، عمل می‌کند [۲۵]. پژوهش برای تولید یک داروی کامل از این گیاه درمانی همچنان ادامه داشته و اطلاعات موجود بسیار اندک می‌باشد. در این تحقیق برای بررسی اثر ضدسرطانی سیلیبینین بر روی مدل سلولی سرطان تخمدان آزمایش سنجش MTT انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سیلیبینین به صورت وابسته به غلظت بعد از ۴۸ ساعت تیمار بر روی رده سلولی

بحث

امروزه دستیابی به درمان سرطان یکی از دغدغه‌های عمده پژوهشگران در زمینه پژوهشکی است و پژوهشگران بدنبال کشف عوامل ضد سرطانی با کمترین خطر و بیشترین اثر برای بیماران می‌باشند. مطالعات زیادی در زمینه ترکیبات دارویی با منشأ طبیعی توجه محققین را به خود جلب کرده است، که خاصیت ضدسرطانی برخی از آنها به مرحله کارآزمایی بالینی رسیده است. با وجود پیشرفت‌های بسیار در استراتژی‌های درمانی سرطان تخدمان، نیاز به تحقیق و پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد.

در طول سه دهه گذشته، بقاء ۵ ساله برای بیماران مبتلا به سرطان تخدمان تا ۳۷-۴۵٪ افزایش یافته است که این عامل مربوط به بهره بردن از جراحی برداشت تومور و شیمی درمانی تراکیبی به وسیله پلاتین و پکلی تاکسل می‌باشد [۲۰]. علی‌رغم اثرات مغاید پکلی تاکسل، این دارو برای بیماران سرطانی اثرات سوء جانبی نیز به همراه دارد. در مطالعه‌ای ۶۲ درصد از بیماران درمان شده با پکلی تاکسل، در معرض خطر لکوپنی قرار گرفته بودند، این دارو معمولاً با سمیت گوارشی و نوروفاتی محیطی نیز همراه بوده است [۲۴]. بنابراین تلاش برای یافتن یک

باعث افزایش در بیان ژن P21 بصورت وابسته به دوز می باشد [۱۷]. همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶ بر روی رده سلولی PC3 (PCA) سرطان پروستات، تأثیر درمانی سیلیبینین از طریق توقف چرخه سلولی در فاز G1 و G2 به S مشاهده شد که با کاهش بیان ژن‌های سایکلین D1 و E1 و D3 و G1 به S متشابه شد که تعدادی از کینازهای وابسته به سایکلین‌ها همراه بود [۲۹]. نتایج به دست آمده ضمن تأثیر پژوهش‌های پیشین درباره سیلیبینین به عنوان یک ماده مؤثر و گیاهی ضدسرطان، تأثیر آن بر روی رده سلولی skov-3 را نیز تصدیق کرد. ضمن اینکه نیاز به پژوهش‌های بیشتر برای یافتن استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان سرطان تخمدان که فاقد اثرات جانبی باشد یا تأثیر درمانی بهتری داشته باشد را تأکید می کند.

نتیجه گیری

رشد سلول‌های سرطانی اپیتلیالی تخمدان (Skov3) توسط تیمار با سیلیبینین بصورت معنی‌دار ($p < 0.05$) مهار شدند؛ بیان ژن P21 که از جمله ژن‌های مؤثر در روند مرگ سلولی می باشد، به صورت افزاینده پس از تیمار با این دارو مشاهده شد. این داده‌ها ضمن تأثیر پژوهش‌های پیشین، سیلیبینین را به عنوان یک رژیم درمانی جدید پیشنهاد می کند، همچنین مطالعات بیشتر در زمان‌های مختلف جهت بررسی مکانیسم و استفاده از این ترکیب جدید بر روی مدل حیوانی ضروری به نظر می رسد.

اثر کشنده دارد IC50 سیلیبینین ۱۹۹/۵ میکرومولار. در مطالعه‌ای همسو با این بررسی که در سال ۲۰۰۳ انجام یافته بود، تأثیر مهاری سیلیبینین بر روی رده‌های سلولی (SCLC) و NSCLC A-549 و SHP-77 آپوپتوز سلول‌های سرطانی MCF-7 در حضور سیلیبینین ۲۰۰ میکرومولار، موجب کاهش ۶۰ درصد در زنده ماندن سلول‌ها شد [۲۷]. همانند یافته‌های مطالعه حاضر، در بررسی دیگری نشان داده شد که سیلیبینین اثر مهاری بالقوه در رشد سلول‌های رده MCF-7 داشته و باعث افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می شود. در این مطالعه، سیلیبینین در غلظت‌های بالای ۲۵ میکرومولار سبب مهار رشد و القای آپوپتوز شد [۲۸].

از جمله اهداف دیگر این طرح، بررسی بیان ژن P21 بود که نتایج به دست آمده بیانگر اثر افزاینده سیلیبینین بر روی بیان ژن P21 بود. بر اساس نتایج بدست آمده، گروه تیمار شده با سیلیبینین نسبت به گروه کنترل بدون تیمار به میزان ۹/۶۸۸ برابر افزایش بیان در ژن P21 نشان داد که می‌تواند بیانگر تأثیر آن در روند مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های رده skov-3 باشد که تا کنون بررسی نشده بود. همسو با این بررسی، مطالعات آگاروال و همکاران نشان داد که اثر سیلیبینین بر روی بیان ژن p21 که یک تنظیم کننده مثبت در فاز G0/G1 و G2/M نشان داد که سیلیبینین

References

- Piek JM, van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 622:79-87.
- Jemal, A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- Kurzeder C, Sauer G, Deissler H. Molecular targets of ovarian carcinomas with acquired resistance to platinum/taxane chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006 May; 6: 207-27.
- Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian Cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011 Sep;108(38):635-41

- 5- Ali AY, Farrand, L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemo resistance: new insights into an old conundrum. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Oct; 1271: 58-67.
- 6- Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012 Feb;31:14.
- 7- Romero I, Robert C, Bast JR. Human Ovarian Cancer: biology current management and paths to personalizing therapy. *Endocrinology.* 2012 Apr;153(4):1593-602.
- 8- Koshiyama M, Matsumura N, Konishi IK. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type I and Type II. *Biomed Res Int.* 2014;2014:934261
- 9- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):212-36.
- 10- Mok SC, Kwong J, Welch WR, Samimi G, Ozbun L, Bonomo T, et al. Etiology and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Dis Markers.* 2007;23(5-6):367-76.
- 11- Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark-Pearson DL, Carson LF, et al. Phase III trial of standard- dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high- dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2001 Apr; 19: 1001-1007.
- 12- Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV, O'Toole R, Williams SD, Young JA, et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1996 Dec;335(26):1950-5.
- 13- Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2006 Jan;354(1):34-43.
- 14- Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, Isonishi S, Jobo T, Aoki D, et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2009 Oct; 374: 1331-1338.
- 15- Kauntz H, Bousserouel S, Gossé F, Raul F. The flavonolignansilibinin potentiates TRAIL-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma and in derived TRAIL-resistant metastatic cells. *Apoptosis.* 2012 Aug;17(8):797-809.
- 16- Kauntz H, Bousserouel S, Gossé F, Raul F. Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived metastatic cells. *Apoptosis.* 2011 Oct;16(10):1042-53.
- 17- Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA, et al. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene.* 2003 Nov;22(51):8271-82.
- 18- Dastpeyman M, Motamed N, Azadmanesh K, Mostafavi E, Kia V, Jahanian-Najafabadi A, et al. Inhibition of silibinin on migration and adhesion capacity of human highly metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231, by evaluation of b1-integrin and downstream molecules, Cdc42, Raf-1 and D4GDI. *Med Oncol.* 2012 Nov; 1559-131.
- 19- Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec;11(23):8441-8.
- 20- El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Herod J, Innes J, Prime W, Herrington CS. Overexpression of cyclins A and B as markers of neoplastic glandular lesions of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2004 Feb;92(2):628-34.
- 21- Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2001 Aug;82(2):238-46.
- 22- Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, Raggi A, Schmidt D, Ruffalo T, et al. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):985-92.
- 23- Ong CC, Jubb AM, Haverty PM, Zhou W, Tran V, Truong T, et al. Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr;108(17):7177-82.

- 24- Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, et al. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma. A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol.* 2004 Oct; 22:2159-66.
- 25- Tiwari P, Mishra KP. Silibinin in cancer therapy: A promising prospect. *Cancer Res Front.* 2015 Sep; 1(3): 303-318
- 26- Sharma G, Singh RP, Chan DC, Agarwal R. Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3):2649-55.
- 27- 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. *J Breast Cancer.* 2011 Mar;14(1):8-13.
- 28- Pirouzpanah MB, Pirouzpanah S, Sabzichi M, Pashaei-Asl R, Pashaei-Asl M, Samadi N. The effects of silibinin on the induction of apoptosis and inhibition of cell growth in MCF-7 breast cancer cell line. *Iran J Nutr Sci & Food Technol.* 2015 Winter; 9 (4): 1-10. [Full Text in Persian]
- 29- Deep G, Singh RP, Agarwal C, Kroll DJ, Agarwal R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanonesilibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene.* 2006 Feb;25(7):1053-69.