

بررسی اثرات سمیت سلولی و آپاپتوز سیلیمارین بر روی رده سلولی سرطان کولون (SW480)

زینب کامرانی^۱، معصومه حشمتی^{۲*} و صادق باباشاه^۳

۱- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، ایران

۲- گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فن آوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، ایران

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

*نویسنده مسئول: معصومه حشمتی، دکتری تخصصی سلولی و مولکولی، drheshmati.cmb@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۶/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۹/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۳

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: سیلیمارین، استخراج شده از گیاه خارمریم، غنی از فلاوونوئیدها مانند سیلیبنین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است و مطالعات متعددی در رابطه با اثرات ضد سرطانی آن صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سمیت سلولی و القاء آپاپتوز ناشی از سیلیمارین بر روی رده سلولی سرطان کولون SW480 و نرمال HEK-293 می‌باشد.

روش مطالعه: در مطالعه حاضر اثرات سمیت سلولی و القاء آپاپتوز ناشی از سیلیمارین بر روی رده سلولی سرطان کولون SW480 و نرمال HEK-293 با روش‌هایی مانند رنگ آمیزی تریپان بلو، آزمون MTT، Annexin V/PI و بیان ژن‌های BAX و BCL2 با تکنیک q-PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو و MTT گویای اثرات القاء سمیت سلولی وابسته به زمان و غلظت در پی تیمار با سیلیمارین در رده سلولی SW480 می‌باشد و غلظت IC50 مشاهده شد. ولی در تیمار سلول‌های نرمال با سیلیمارین غلظت IC50 مشاهده نشد. همچنین افزایش القاء آپاپتوز در رده سلولی سرطانی SW480 در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و افزایش نسبت بیان ژن‌های BAX/BCL2 در مقایسه با گروه کنترل منفی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر سیلیمارین به عنوان یک فاکتور القاء‌کننده سمیت و آپاپتوز سلولی در رده سلول سرطانی کولون بدون ایجاد سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال نقش دارد و می‌تواند به عنوان یک مکمل جهت درمان موثر سرطان کولون پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: سیلیمارین، سمیت سلولی، آپاپتوز، سرطان کولون

مقدمه

عوارض جانبی نامطلوب داروهای شیمی درمانی استفاده از ترکیبات دارویی با ساختار گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته شده است. در مطالعات متعددی گزارش شده است که مصرف برخی از فرآورده‌های گیاهی به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی در حذف رادیکال‌های آزاد در جلوگیری از بروز سرطان نقش موثری دارند (Chirumbolo et al., 2018).

سیلیمارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) استخراج می‌گردد. اعضای مختلف گیاه خارمریم دارای تانن، رزین، آمیدون و مواد آلبومینوئیدی است.

سرطان دومین علت مرگ و میر در سراسر جهان است. علائم پیشرفت‌های قابل توجه در درمان و تشخیص، همچنان کمبودهای چشمگیری در زمینه بهبود و درمان سرطان وجود دارد (Pashah et al., 2019; Hekmat et al., 2020; Siegel et al., 2020). کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها است که روش‌های مختلفی جهت درمان آن مانند جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و ایمونوتراپی وجود دارد (Mehta and Patel, 2019). در سال‌های اخیر به دلیل

شدند و در انکوباتور با دمای °C ۳۷ حاوی ۵٪ از CO₂ قرار داده شدند. جهت تیمار سلول‌ها پودر سیلیمارین خریداری شده در DMSO استریل به صورت محلول تهیه شد و در غلظت‌های ۶.۲۵، ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ µg/mL به صورت سریال رقتی تهیه گردید.

تعیین قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو: رنگ آمیزی به روش تریپان بلو، جهت ارزیابی یکپارچگی غشا سلول‌ها و سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها صورت گرفت. به منظور انجام این تست تعداد 2×10^4 از سلول سرطانی و نرمال در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت، تیمار سلول‌ها با سیلیمارین در غلظت‌های صفر، ۶.۲۵، ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت و درصد سلول‌های زنده با فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{میانگین تعداد کل سلول‌ها} / \text{میانگین تعداد سلول‌های زنده}) = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

بررسی سمیت سلولی تیمار شده با سیلیمارین با آزمون MTT: به منظور بررسی اثر سیلیمارین بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نرمال، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش براساس توانایی سلول‌های زنده در احیاء نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده است. جهت انجام آزمایش سلول‌های SW480 و HEK-293 در پلیت ۹۶ خانه‌ای، به میزان 6×10^3 سلول در هر چاهک و در حجم ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. سه چاهک به عنوان شاهد صفر فقط ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در °C ۳۷ سلول‌ها با غلظت‌های صفر، ۶.۲۵، ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ µg/mL در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بعد از اتمام زمان تیمار ۵ mg/ml از محلول MTT به میزان ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۳۷ محلول رویی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO به هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۷۰ nm توسط دستگاه الایزا اندازه‌گیری شد. جهت افزایش بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایشات به صورت سه تایی انجام شد.

بررسی القا آپتوز سلولی با استفاده از کیت Annexin/PI: یکی از روش‌های مورد استفاده جهت بررسی آپتوز، آنالیز و مطالعه مولکول‌های فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا به هنگام فرآیند آپتوز است. مولکول‌های Annexin-V یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدها در حضور یون کلسیم می‌باشد. بنابراین برای

سیلیمارین شامل سه ایزومر اصلی شامل سیلی بین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است که بیشترین اثرات گیاه خارمریم را به این دسته از مواد نسبت داده اند (Federico et al., 2017; Tuli et al., 2020). اثرات ضدسرطانی سیلیمارین و سیلی بین بر روی مدل حیوانی سرطانی و رده‌های سلولی سرطانی متعددی مانند پروستات، سینه، کبد، کولون، تخمدان، لمفوم و لوسمی گزارش شده است (de Avelar et al., 2017; Delmas et al., 2020). اثر سیلیبین بر روی دو رده سلولی سرطان سینه MDA-MB-231 و MCF-7 به صورت کشت تک لایه سلولی و کشت اسفروئید، با تکنیک‌های 5-bromo-2'-deoxyuridin labeling Index، رنگ‌آمیزی سیتوشیمی و terminal deoxynucleotidyl transferase مورد بررسی قرار گرفت و IC₅₀ در حدود ۱۰۰ µm/ml در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ گزارش شد و افزایش مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (Bayram et al., 2017). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که سیلیمارین و سیلیبین به طور چشمگیری در افزایش بیان Bim و القاء آپتوز در سلول‌های سرطانی غدد بزاقی HN22 و MC3 و همچنین مهار مسیر ERK1/2 نقش دارند (Choi et al., 2017). در مطالعه‌ای اثرات محافظتی در کبد و کلیه موشی در تیمار با MTX در کودکان مبتلا به ALL گزارش شد (Hagag et al., 2016). همچنین اثرات ضد تکثیر، ضد التهابی و محافظتی سیلیمارین به همراه کورکومین در مدل سرطان کولون در شرایط *in vivo* گزارش شد (Girardi et al., 2018). هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات سمیت سلولی و القا آپتوز ناشی از سیلیمارین در رده سلولی سرطان کولون SW480 و رده سلولی نرمال HEK-239 می‌باشد.

روش مطالعه

مواد: در این مطالعه سرم جنین گاوی Fetal Bovine serum (FBS)، محیط کشت DMEM، پنی سیلین، استرپتومایسین، رنگ MTT و تریپان بلو و دیگر معرف‌ها با درجه خلوص بالا از شرکت سیگما تهیه شدند. سیلیمارین به شکل پودری از شرکت باریج اسانس تهیه گردید.

کشت و تیمار سلول‌ها: سلول‌های مورد مطالعه در این تحقیق رده‌ی سلولی سرطان کولون (SW480) مربوط به روده بزرگ انسانی و رده‌ی سلولی نرمال (HEK-293) مربوط به اپیتلیال کلیه انسانی است که از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری گردید. سلول‌های مورد نظر در محیط کشت DMEM حاوی L-گلوتامین ۲ میلی‌مولار، ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBS، پنی‌سیلین به میزان 100 unit/mL و استرپتومایسین به میزان 100 µg/mL کشت داده

جدول ۱- ویژگی‌های پرایمرهای طراحی شده

Genes	Forward and Reverse Primer	Length (bp)	T _M (°C)
BAX	F: ACCGCCTCACTCAC CATCT	19	58.83
	R: GACCACTCTTCCC ACACC	19	60.98
BCL2	F: CAGACACACACAC ACACAACAA	22	58.32
	R: TTTACAGGCACAG AACATCCA	21	59.45
Bactin	F: GGCACCCAGCACA ATGAAG	19	58.83
	R: CCGATCCACACGG AGTACTT	21	61.78

نتایج

بررسی درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان

بلو: نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو گویای آن است که سیلیمارین باعث مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی کولون SW-480 در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 می‌شود. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است در تمامی غلظت‌ها در زمان‌های مشخص شده کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی SW480 و نرمال HEK293 مشاهده می‌گردد. کاهش معنی‌دار درصد زنده‌مانی در غلظت‌های ۵۰۰-۱۲.۵ در زمان ۲۴ ساعت ($p \leq 0.0001$) و در محدوده غلظتی $\mu\text{g/ml}$ ۵۰۰-۶.۲۵ در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید ($p \leq 0.0001$). بالاترین درصد زنده‌مانی در غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۶.۲۵ به میزان $10.11 \pm$ ۸۷.۷۵۹ در مدت زمان ۲۴ ساعت و کمترین درصد زنده‌مانی در غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۵۰۰ به میزان 1.175 ± 9.464 در مدت زمان ۷۲ ساعت در تیمار با سیلیمارین گزارش شد. میزان درصد IC50 در رده سلولی سرطانی SW480 در آزمون تریپان بلو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب $\mu\text{g/ml}$ ۱۸۸، ۱۳۹ و ۷۴.۰۹ مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی درصد زنده‌مانی رده سلولی نرمال HEK-293 در پی تیمار با سیلیمارین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آزمون تریپان بلو نشان دهنده عدم مرگ سلولی به میزان IC50 می‌باشد. کاهش معنی‌دار درصد زنده‌مانی در غلظت‌های $\mu\text{g/ml}$ ۲۵۰-۵۰۰ در زمان ۲۴ ساعت ($p \leq 0.0001$) و در محدوده غلظتی $\mu\text{g/ml}$ ۵۰۰-۵۰ در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید

تشخیص سلول‌های در حال آپاتوز در یک جمعیت سلولی بسیار مناسب است. به منظور شمارش در صد آپاتوزی و نکروزی از کیت تشخیصی Annexin-V-florescencing Kit استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در پلیت ۶ خانه در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C و ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. سپس غلظت‌های انتخابی حاصل از نتایج روش‌های تریپان بلو و MTT به چاهک‌ها به صورت سه بار تکرار اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. سلول‌ها پس از تیمار جمع‌آوری، دوبار با PBS شستشو داده شدند. سپس PI و Annexin-V به سوسپانسیون سلولی موجود در بافر اتصال شونده اضافه گردید. سلول‌ها در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C انکوبه شدند و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences FACS Calibur™) آنالیز شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت بررسی بیان ژن‌های

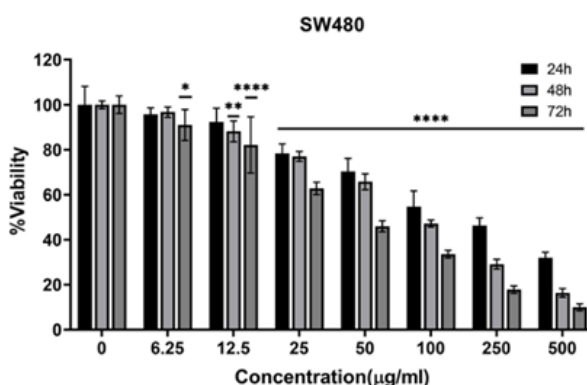
BAX و BCL2 فلاسک‌های مورد نظر تریپسینه شدند و RNA سلولی با کیت یکتا تجهیز (Super RNA Extraction kit for Tissue&Cells (cat:YT9080 بر اساس پروتکل کیت استخراج شد و با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermofisher) مقدار خلوص RNA کل تعیین و نسبت جذب نوری (RNA OD: optical density) در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ nm سنجیده شد. در این مطالعه از نمونه‌هایی که نسبت OD آنها بین ۱/۸-۲/۲ نانومتر بود برای سنتز cDNA استفاده گردید. سپس مقدار μg ۵-۱ از RNA را با استفاده از کیت مخصوص سنتز cDNA، cDNA Synthesis kit (cat:YT4500) طبق پروتکل کیت به cDNA رونویسی معکوس شد. واکنش Real-time PCR در دستگاه ABI-step one انجام شد. جهت ارزیابی بیان ژن از پرایمرهای مخصوص ژن‌های BAX و BCL2 استفاده گردید (جدول ۱).

پرایمرهای پروآپتوتیک BAX، BCL2 و ژن رفرنس Bactin توسط نرم افزار Primer-3 plus و در سایت NCBI بلاست گردید و به واسطه کیت SYBER Green QPCR Master MIX (amplicon) بیان نسبی ژن‌ها اندازه‌گیری شد. مولکول فلوروسنت (سایبرگرین) برای مشاهده پیشرفت RT-PCR استفاده شد و بررسی بیان نسبی ژن‌ها براساس مقایسه سیکل‌های آستانه نمونه‌های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak) انجام شد.

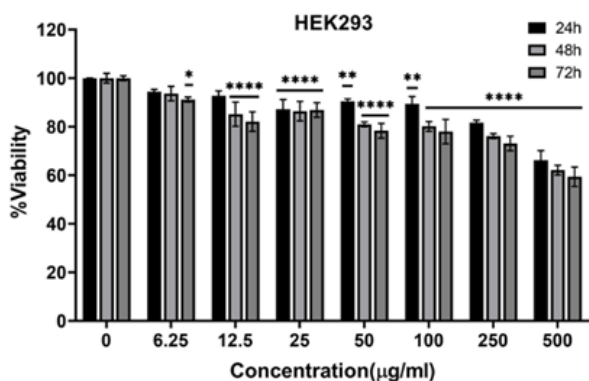
روش آماری: جهت بررسی‌های آماری از نرم افزار Graphpad

Prism استفاده شد. تفاوت میانگین داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی ارزیابی شد. اختلاف میانگین داده‌ها با $p \leq 0.05$ به صورت معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها براساس میانگین \pm انحراف از معیار نشان داده شده است.

شد. از بررسی در صد زنده‌مانی رده سلولی نرمال HEK-293 در پی تیمار با سیلیمارین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آزمون MTT غلظت IC50 گزارش نشد. کاهش در صد زنده‌مانی با اختلاف معنی‌دار در محدوده غلظتی ۲۵-۵۰۰ µg/ml در زمان ۲۴ ساعت و ۱۲.۵-۵۰۰ µg/ml در زمان ۴۸ ساعت و ۶.۲۵-۵۰۰ µg/ml در زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید (نمودار ۴). بالاترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۶.۲۵ به میزان ۹۴.۴۳ ± ۰.۵۷۱٪ در مدت زمان ۲۴ ساعت و کمترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۵۰۰ µg/ml به میزان ۵۹.۳۸ ± ۲.۳۰۹٪ در مدت زمان ۷۲ ساعت گزارش شد.



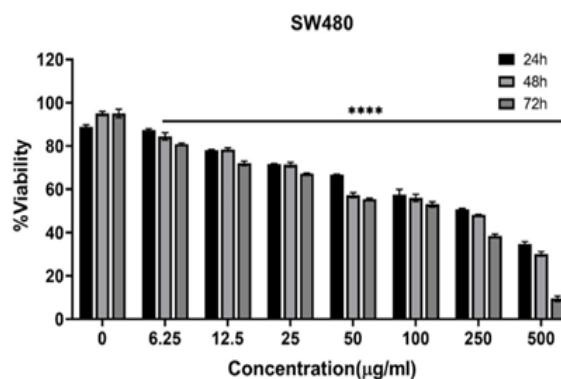
نمودار ۳- مقایسه درصد زنده‌مانی رده سلولی SW480 در پی تیمار با سیلیمارین با آزمون MTT



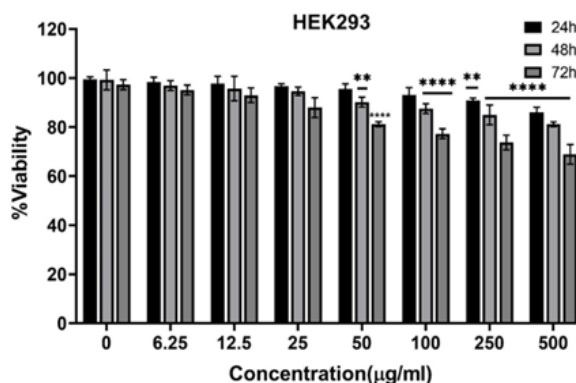
نمودار ۴- مقایسه درصد زنده‌مانی رده سلولی HEK-293 در پی تیمار با سیلیمارین با آزمون MTT

نتایج بررسی آپاپتوز با کیت Annexin/PI: با توجه به نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و آزمون MTT، غلظت ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ در مدت زمان ۴۸ ساعت جهت بررسی آپاپتوز با کیت Annexin/PI از طریق فلوسایتومتری در رده سلولی سرطانی SW480 انتخاب شد. همانطور که در نمودار ۵ و ۶ نشان داده شده است افزایش معناداری از درصد آپاپتوز در حدود ۳۶۴ و ۳۵۳ برابر در تیمار با غلظت ۵۰ µg/ml و ۱۰۰ در مقایسه با کنترل مشاهده گردید تفاوت معنی‌داری

($p \leq 0.0001$) بالاترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۶.۲۵ µg/ml به میزان ۱.۵۵ ± ۸۶.۰۸٪ در مدت زمان ۲۴ ساعت و کمترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۵۰۰ µg/ml به میزان ۶۸.۹ ± ۲.۳۰۹٪ در مدت زمان ۷۲ ساعت در تیمار با سیلیمارین مشاهده گردید.



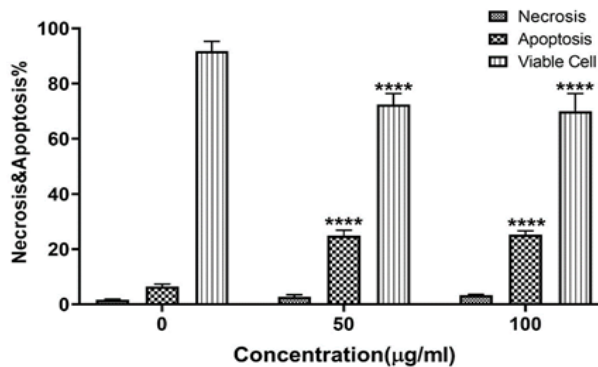
نمودار ۱- مقایسه درصد زنده‌مانی رده سلولی SW480 در پی تیمار با سیلیمارین با آزمون تریپان بلو



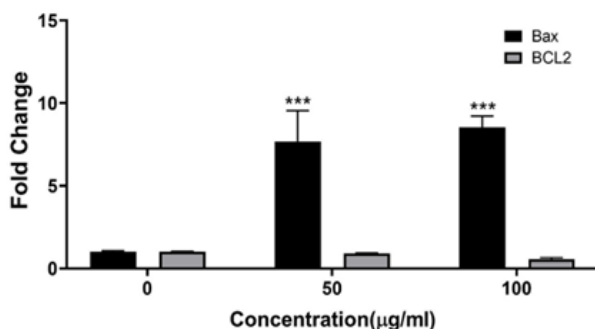
نمودار ۲- مقایسه درصد زنده‌مانی رده سلولی HEK-293 در پی تیمار با سیلیمارین با آزمون تریپان بلو

بررسی درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با آزمون MTT: نتایج حاصل از آزمون MTT گویای افزایش مرگ سلولی ناشی از تیمار سیلیمارین در سلول‌های سرطانی کولون SW-480 در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 می‌باشد. همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است در تمامی غلظت‌ها در زمان‌های مشخص شده کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی SW480 مشاهده می‌گردد. کاهش معنی‌دار در صد زنده‌مانی در محدوده غلظتی ۶.۲۵-۵۰۰ در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید ($p \leq 0.0001$) بالاترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۶.۲۵ µg/ml به میزان ۹۴.۴۳ ± ۰.۵۷۱٪ در مدت زمان ۲۴ ساعت و کمترین درصد زنده‌مانی در غلظت ۵۰۰ µg/ml به میزان ۵۹.۳۸ ± ۲.۳۰۹٪ در مدت زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید. میزان IC50 در رده سلولی سرطانی SW480 در آزمون MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۷۰.۹، ۹۴.۴۹، و ۴۷.۹۳ گزارش

معنی‌دار ($p \leq 0.001$) بیان نسبی ژن BAX به میزان 6.82 ± 0.3 و 8.525 ± 0.4 در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ در مقایسه با کنترل مشاهده شد (نمودار ۷). همانطور که در نمودار ۸ نشان داده شده است افزایش نسبت BAX / BCL2 در سلول سرطانی SW480 تیمار شده با سیلیمارین به میزان 8.438 و 15.55 به ترتیب در غلظت‌های $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ در مقایسه با کنترل مشاهده می‌شود.



نمودار ۶- مقایسه درصد آپتوز و نکروز در رده سلولی سرطانی SW480 در پی تیمار با سیلیمارین.

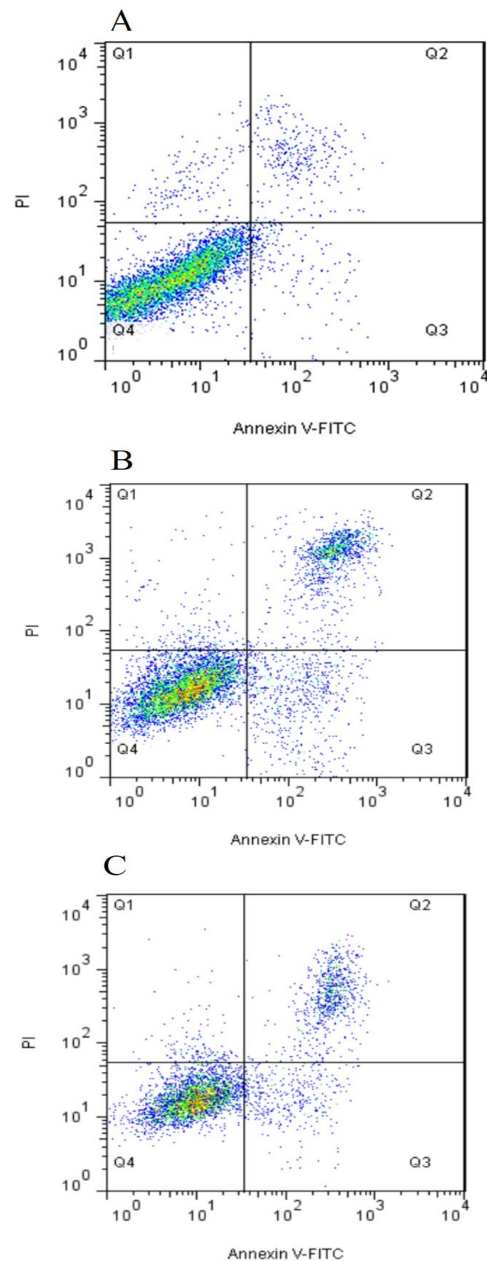


نمودار ۷- تغییرات بیان ژن BAX و BCL2 در رده سلولی SW480 تیمار شده با سیلیمارین در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ در مدت زمان ۴۸ ساعت.

بحث

سرطان کولون یکی از سرطان‌های رایج در جهان می‌باشد که جهت درمان آن از جراحی و روش‌هایی چون شیمی درمانی و رادیوتراپی استفاده می‌شود (Siegel *et al.*, 2020). گزارشات متعددی در رابطه با اثرات نامطلوب شیمی‌درمانی و رادیوتراپی بر روی سلول‌های سالم و ایجاد مقاومت دارویی در سلول‌های سرطانی وجود دارد (Siegel *et al.*, 2020). طبق مطالعات صورت گرفته استفاده همزمان داروهای شیمیایی با ترکیبات طبیعی مانند پلی فنول‌ها می‌تواند منجر به استفاده از دوز پایین داروهای شیمیایی شود. گیاهان حاوی محدوده وسیعی از ترکیبات موثر می‌باشند که بعضی از آنها قابلیت حفاظت از سلول‌ها را

بین درصد آپتوز در غلظت‌های $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ مشاهده نشد. همچنین کاهش معنی‌دار سلول‌های زنده در مقایسه با کنترل گزارش گردید.



نمودار ۵- دیاگرام بررسی درصد آپتوز و نکروز در پی تیمار با سیلیمارین در رده سلولی SW480. A: کنترل، B: تیمار در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و C: تیمار در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$

بررسی بیان ژن‌های BAX و BCL2: در سلول‌های سرطانی SW480 تیمار شده با سیلیمارین کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن BCL2 به میزان 0.96 ± 0.03 و 0.553 ± 0.06 برابری به ترتیب در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ و $100 \mu\text{g/ml}$ گزارش شد ($p \leq 0.001$). همچنین افزایش

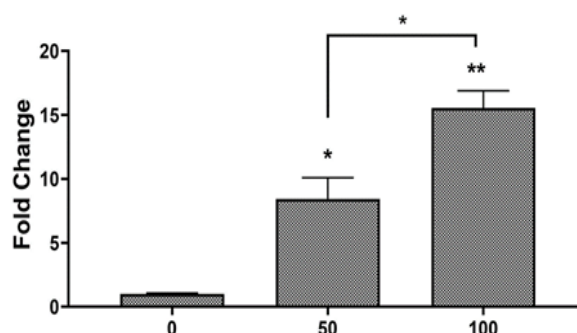
افزایش اثر سیس پلاتین و حفاظت شدگی از سلول‌های رنال در تیمار با سیسپلاتین گزارش شده است (Soodvilai *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای گزارش شده است که اثرات سینرژیستی سیلیمارین با (DLX) combined liposomal doxorubicin در غلظت‌های پایین باعث مهار رشد رده سلول‌های سرطان سینه 4T1 در شرایط *in vitro* می‌شود (Gheybi *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای اثرات silymarin-nanostructured lipid carrier (NLC) بر روی رده سلولی سرطانی ملانوما B16 و مدل موشی albino بررسی شد. و اثرات ضد تکثیر، ضد التهابی، آنتی اکسیدانت، ضد توموری مشاهده شد. همچنین کاهش فاکتورهای IL-1 α و TNF α و افزایش فاکتورهای سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون (GSH) مشاهده شد (Iqbal *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای دیگر اثرات ضدسرطانی و ضد آپتوزی سیلیمارین بر روی سلول‌های سرطانی معده AGS صورت گرفته است و کاهش زنده‌مانی و مهاجرت سلولی، افزایش بیان فاکتورهای BAX, JNK, p-P38 و کاهش بیان BCL2, p-ERK1/2 گزارش شد (Kim *et al.*, 2019). اثرات ضد سرطانی، توقف سیکل سلولی و القاء آپتوز و کاهش بیان STAT3 در رده سلولی سرطانی اندومتريال در تیمار با سیلیمین گزارش شد (Shi *et al.*, 2019). همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر سیلیمارین بر روی رده سلول‌های سرطانی دهان، YD15, HSC4, Ca9.22 بررسی شد و القاء آپتوز و افزایش بیان رسپتور 5، کاسپاز 8، Bid، و تجمع سیتوکروم C گزارش شد (Won *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای اثر سیلیمارین و سیلیمین بر روی رده سلولی سرطانی پروستات PC-3 بررسی شد و القاء مرگ سلولی، آپتوز و توقف سیکل سلولی در فاز G1 و G2/M وابسته به زمان و غلظت گزارش شد (Deep *et al.*, 2006). براساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و سایر مطالعات صورت گرفته سیلیمارین به عنوان یک ساختار با خاصیت ضدسرطانی و یک ادجوانت مناسب در درمان سرطان بدون القاء اثرات سمی بر روی سلول‌های نرمال پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر سیلیمارین به عنوان یک فاکتور القاء کننده سمیت و آپتوز سلولی در رده سلول سرطانی کولون بدون ایجاد سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال نقش دارد. استفاده همزمان داروهای شیمیایی با سیلیمارین به دلیل غنی بودن فلاوولیگنان‌های موجود مانند سیلیمین می‌تواند منجر به استفاده از دوز پایین داروهای شیمیایی و کاهش عوارض جانبی شود.

تقدیر و تشکر

در مقابل فرآیندهای متفاوت القاکننده سرطان در سلول دارند (Chirumbolo *et al.*, 2018; Farag *et al.*, 2020).



نمودار ۸- نسبت بیان ژن BCL2/BAX در رده‌ی سلولی SW480 تیمار شده با سیلیمارین در غلظت 50 و 100 µg/ml در مدت زمان 48 ساعت.

سیلیمارین استخراج شده از دانه و میوه گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) حاوی یک فلاوونوئید (taxifolin) و هفت فلاوولیگنان شامل سیلی کریستین A و B، سیلیدیانین، سیلیمین A و B، ایزو سیلیمین A و B می‌باشد که در بین آنها سیلیمین (سیلیمینین) فراوان‌ترین فلاوولیگنان استخراج شده از سیلیمارین می‌باشد (Tuli *et al.*, 2020). در مطالعات اخیر اثرات چشمگیر ضدسرطانی سیلیمارین در سرطان‌های متعددی مانند سینه، پروستات، کولون، کبد و غیره گزارش شده است (de Avelar *et al.*, 2017). در مطالعه حاضر اثرات سمیت سلولی و القاء آپتوز ناشی از سیلیمارین بر روی رده سلولی سرطان کولون SW480 و نرمال HEK-293 بررسی شد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و آزمون MTT گویای اثرات القاء سمیت سلولی وابسته به زمان و غلظت در پی تیمار با سیلیمارین در رده سلولی SW480 می‌باشد و غلظت IC50 مشاهده شد. ولی در تیمار سلول‌های نرمال با سیلیمارین غلظت IC50 مشاهده نشد. همچنین افزایش القاء آپتوز در رده سلولی سرطانی SW480 در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین در غلظت 50 و 100 µg/ml و افزایش نسبت بیان ژن‌های BAX/BCL2 در مقایسه با گروه کنترل منفی مشاهده شد.

مطالعات متعددی در رابطه با اثرات سیلیمارین بر روی رده‌های سلولی سرطانی صورت گرفته است (Tuli *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های سرطان غدد بزاقی گزارش شده است که سیلیمارین موجب مهار رشد سلول‌ها و افزایش بقاء سلول‌ها به واسطه تداخل در بیان ژن‌های تنظیم کننده سیکل سلولی و آپتوز می‌شود. همچنین افزایش آزادسازی سیتوکروم C موجب افزایش بیان پروتئین Bim و فعال‌سازی کاسپازهای 3 و 9 می‌شود (Choi *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای اثر سیلیمارین بارگذاری شده بر روی میسل‌های پلی‌مریک بر روی سمیت سلول‌های رنال و بررسی تغییر فعالیت ضد سرطانی سیس پلاتین مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل حاکی از

مراجع

- Bayram, D., Çetin, E.S., Kara, M., Özgöçmen, M. and Candan, I. 2017. The apoptotic effects of silibinin on mda-mb-231 and mcf-7 human breast carcinoma cells. *Human & experimental toxicology*, 36(6): 573-586.
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L. and Upyr, T. 2018. Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of the cell survival signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, 19(11): 3568.
- Choi, E.-S., Oh, S., Jang, B., Yu, H.-J., Shin, J.-A., Cho, N.-P., Yang, I.-H., Won, D.-H., Kwon, H.-J. and Hong, S.D. 2017. Silymarin and its active component silibinin act as novel therapeutic alternatives for salivary gland cancer by targeting the erk1/2-bim signaling cascade. *Cellular Oncology*, 40(3): 235-246.
- de Avelar, C.R., Pereira, E.M., de Farias Costa, P.R., de Jesus, R.P. and de Oliveira, L.P.M. 2017. Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 23(27): 5004.
- Deep, G., Singh, R., Agarwal, C., Kroll, D. and Agarwal, R. 2006. Silymarin and silibinin cause g1 and g2-m cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer pc3 cells: A comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene*, 25(7): 1053-1069.
- Delmas, D., Xiao, J., Vejux, A. and Aires, V. 2020. Silymarin and cancer: A dual strategy in both in chemoprevention and chemosensitivity. *Molecules*, 25(9): 2009.
- Farag, R.S., Abdel-Latif, M.S., Abd El Baky, H.H. and Tawfeek, L.S. 2020. Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices. *Biotechnology Reports*, 28: e00536.
- Federico, A., Dallio, M. and Loguercio, C. 2017. Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*, 22(2): 191.
- Gheybi, F., Alavizadeh, S.H., Rezayat, S.M., Zendedel, E. and Jaafari, M. 2019. Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin liposomes in 4t1 breast cancer cells. *Nanomedicine Research Journal*, 4(1): 29-34.
- Girardi, B., Principi, M., Pricci, M., Giorgio, F., Iannone, A., Losurdo, G., Ierardi, E., Di Leo, A. and Barone, M. 2018. Chemoprevention of inflammation-related colorectal cancer by silymarin-, acetyl-11-keto-beta-boswellic acid-, curcumin-and maltodextrin-enriched dietetic formulation in animal model. *Carcinogenesis*, 39(10): 1274-1282.
- Hagag, A.A., Elgamsy, M.A., El-Asy, H.M. and Mabrouk, M.M. 2016. Protective role of silymarin on hepatic and renal toxicity induced by mtz based chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 8(1).
- Hekmat, A., Salavati, F. and Tackallou, S.H. 2020. The effects of paclitaxel in the combination of diamond nanoparticles on the structure of human serum albumin (hsa) and their antiproliferative role on mda-mb-231 cells. *The Protein Journal*: 1-16.
- Iqbal, B., Ali, J., Ganguli, M., Mishra, S. and Baboota, S. 2019. Silymarin-loaded nanostructured lipid carrier gel for the treatment of skin cancer. *Nanomedicine*, 14(9): 1077-1093.
- Kim, S.H., Choo, G.S., Yoo, E.S., Woo, J.S., Han, S.H., Lee, J.H. and Jung, J.Y. 2019. Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the mapk signaling pathway in ags human gastric cancer cells. *Oncology reports*, 42(5): 1904-1914.
- Mehta, A. and Patel, B.M. 2019. Therapeutic opportunities in colon cancer: Focus on phosphodiesterase inhibitors. *Life sciences*, 230: 150-161.
- Pashah, Z., Hekmat, A. and Hesami Tackallou, S. 2019. Structural effects of diamond

این مطالعه حاصل از پایان نامه دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. از همکاران مرکز تحقیقات علوم دارویی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

- nanoparticles and paclitaxel combination on calf thymus DNA. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 38(4): 249-278.
- Shi, Z., Zhou, Q., Gao, S., Li, W., Li, X., Liu, Z., Jin, P. and Jiang, J. 2019. Silibinin inhibits endometrial carcinoma via blocking pathways of stat3 activation and srebp1-mediated lipid accumulation. *Life sciences*, 217: 70-80.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A. and Jemal, A. 2020. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(3): 145-164.
- Soodvilai, S., Tipparos, W., Rangsimawong, W., Patrojanasophon, P., Soodvilai, S., Sajomsang, W. and Opanasopit, P. 2019. Effects of silymarin-loaded amphiphilic chitosan polymeric micelles on the renal toxicity and anticancer activity of cisplatin. *Pharmaceutical development and technology*, 24(8): 927-934.
- Tuli, H.S., Mittal, S., Aggarwal, D., Parashar, G., Parashar, N.C., Upadhyay, S.K., Barwal, T.S., Jain, A., Kaur, G. and Savla, R. 2020. Path of silibinin from diet to medicine: A dietary polyphenolic flavonoid having potential anti-cancer therapeutic significance. In: *Seminars in Cancer Biology*. Elsevier.
- Won, D.-H., Kim, L.-H., Jang, B., Yang, I.-H., Kwon, H.-J., Jin, B., Oh, S.H., Kang, J.-H., Hong, S.-D. and Shin, J.-A. 2018. In vitro and in vivo anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumor Biology*, 40(5): 1010428318776170.

Evaluation effects of silymarin on cytotoxicity and apoptosis on SW480 colon cancer cell line

Zainab Kamrani¹, Masoumeh Heshmati^{2,*}  and Sadegh Babashah³

¹ Pharmaceutical sciences center. Tehran medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Correspondence to Masoumeh Heshmati, Ph.D., drheshmati.cmb@gmail.com

Received 12th September 2020 Revised 10th December 2020 Accepted 21st February 2021

Abstract

Introduction and Aim: Silymarin, extracted from the milk thistle, is rich in flavolignans such as silybinin, silidianin, and silycristine. Several studies have been done on its anticancer effect. This study aimed to evaluate the effects of cytotoxicity and induction of silymarin-induced apoptosis on colon cancer SW480 and normal HEK-293 cell lines.

Methods: In the present study, the effect of cytotoxicity and apoptosis induction by silymarin on colon cancer SW480 and Normal HEK-293 cell lines were investigated by different methods such as trypan blue staining, MTT assay, Annexin V/PI staining, and evaluating the expression level of BAX and BCL2 Genes by q-PCR technique.

Results: The results of the trypan blue staining and MTT assay indicated the cytotoxicity effects of silymarin in SW480 cells in a time-dependent manner. The IC₅₀ was also evaluated. However, no cytotoxic effects were observed in HEK-293 cells after treatment with silymarin. Also, an increase of apoptosis in SW480 cells that were treated with 50 and 100 µg/mL silymarin was observed. An increase in BAX/BCL2 gene expression level was also observed in SW480 cells compared to HEK-293 cells.

Conclusion: According to the results of the present study, silymarin can induce toxicity and cell apoptosis in the colon cancer cell line without causing cytotoxicity in the normal cell line. So silymarin can be suggested for effective treatment of colon cancer.

Keywords: Silymarin, Cytotoxicity, Apoptosis, Colon cancer