

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

Pashaei-Asl F<sup>1,2</sup>, Pashaiasl M<sup>3,4\*</sup>

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 cm<sup>2</sup> 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 اپیتلیالی تخمدان و بررسی بیان ژن P21

فاطمه پاشائی اصل<sup>۱،۲</sup>؛ مریم پاشائی اصل<sup>۳،۴</sup>\*

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 باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۴. گروه علوم تشریحی 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 تخمدان یکی از کشنده ترین سرطان‌های زنان می باشد و نوع اپیتلیالی آن، شایع ترین فرم تومورهای بدخیم تخمدان را شامل می شود. از جمله درمان‌های مرسوم، استفاده از شیمی درمانی می باشد، اما با استفاده متداول از این روش درمانی، عوارض جانبی و مقاومت دارویی نیز مشاهده می شود که موجب عدم پاسخ مناسب به درمان می باشد. 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 می گرفت 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 تخمدان و بررسی بیان ژن p21، که دخیل در پیشرفت چرخه سلولی می باشد.

**روش کار:** رده سلولی SKOV-3 سرطان اپیتلیالی تخمدان انسانی، بصورت تک لایه داخل فلاسک‌های 25 cm<sup>2</sup> در محیط RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند، سلول‌های زنده به وسیله هموسایتومتر 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 می باشد و بررسی بر روی مدل حیوانی پیشنهاد می شود.

**واژه‌های کلیدی:** سیلیبینین، p21، سلول سرطان تخمدان، بیان ژن

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۶

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

## مقدمه

سرطان‌های زنان محسوب می شود و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی که بیماری به مراحل پیشرفته رسیده است تشخیص داده شده و عمدتاً غیرقابل درمان می باشد [۴،۳]. انواع مختلفی از سرطان در تخمدان ممکن است بوجود آید ولی شایع ترین فرم تومورهای بدخیم تخمدانی از نوع اپیتلیالی می باشد [۵،۶]. در

سرطان تخمدان از جمله شایع ترین سرطان‌های دستگانه تناسلی زنان می باشد [۱]. تخمین زده می شود در سراسر جهان سالانه بیش از ۱۴۰۰۰۰ مرگ ناشی از این بیماری اتفاق می افتد [۲]. این سرطان به دلیل علائم خاص و تشخیص دیر هنگام، از جمله کشنده ترین نوع

سرطانی سیلیبیین بخصوص در سرطان‌های اپیتلیالی مانند پوست، پروستات و ریه روشن شده است [۱۶،۱۵]. اثرات ضدسرطانی، ایمن و غیر سمی سیلیبیین بر روی برخی از سلول‌های انسانی بررسی شده است که در راستای اهداف آپوپتوتیک، ضد تقسیم سلولی، ضدگرزایی و متابولیسم سلول سرطانی می‌باشد ولی مکانیسم این اثرات کاملاً متفاوت، هنوز بررسی کامل نشده است [۱۷،۱۶]. در مطالعه‌ای که بر روی رده سلولی MDA-MB-231 و بیان ژن Raf-1 و Cdc42 انجام گرفت، سیلیبیین سبب کاهش تقسیم سلولی شده و در نهایت اثر ضد سرطانی آن مشاهده گردید [۱۸]. همچنین در رده سلولی HepG2 و Hep3B، سیلیبیین 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<sup>۲</sup> (CKI) می‌باشد، پروتئین P21 به کمپلکس CDK2-cyclin-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<sup>۳</sup> 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 سیلیبیین در مدت زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار بر روی رده سلولی سرطان اپیتلیالی تخمدان و بررسی بیان ژن P21 می‌باشد. شناسایی تاثیر این دارو در رده سلولی سرطانی تخمدان می‌تواند دید بهتری نسبت به تدوین و اجرای پروتکل‌های درمانی در اختیار قرار دهد.

مطالعه‌ای، میزان ابتلا به نوع اپیتلیالی سرطان تخمدان را بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان بیان کرده است که ناشی از سلول‌های اپیتلیالی پوشاننده سطح تخمدان 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 یائسگی احتمال ابتلا به سرطان‌های زنان و از جمله آنها سرطان تخمدان افزایش می‌یابد [۸]. اگر چه بسیاری از تکنیک‌های جراحی و شیمی‌درمانی برای سرطان تخمدان توسعه یافته‌اند، اما به دلیل پیش آگهی ضعیف، میزان بقا 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 تخمدان شامل برداشتن توده توموری توسط جراحی به همراه شیمی‌درمانی کمکی می‌باشد [۵]. شیمی‌درمانی استفاده از داروهای خاصی است که رشد سلول‌های سرطانی را متوقف یا کند می‌کند. 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 شیمی‌درمانی هستند که در درمان سرطان تخمدان استفاده می‌شوند [۷]. پکلی تاکسل بصورت غیر کووالانسی 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]. شیمی‌درمانی معمولاً هر سه هفته یکبار تجویز می‌شود [۱۴]. با رواج شیمی‌درمانی، علی‌رغم اثرات مفید آن، اثرات سوء درمان نیز بارزتر شده است. امروزه بهره بردن از درمان‌های جایگزین امن تر و بی‌خطر مانند استفاده از داروهایی با منبع گیاهی برای درمان سرطان افزایش یافته است. سیلیبیین ماده موثره گیاه خار مریم<sup>۱</sup> با نام علمی *Silybum marianum* می‌باشد که اثرات ضد سرطانی آن مشاهده شده است [۱۵]. امروزه اثر ضد

<sup>۱</sup> Milk Thistle<sup>۲</sup> Cyclin Kinase Inhibitor<sup>۳</sup> GAP 1 Phase to Synthesis Phase

## روش کار

## کشت سلولی

در این تحقیق به منظور بررسی اثر سیلیبینین، از رده سلولی سرطان SKOV-3 تخمدان (انسیتو پاستور ایران) برای کشت سلولی استفاده شد. برای انجام این آزمایشات، سلول‌های SKOV-3 به صورت تک لایه در محیط RPMI-1640 (Gibco، انگلستان) حاوی سرم ۱۰٪ FBS<sup>۱</sup> (Gibco، آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک پنسیلین (Sigma، آمریکا) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Sigma، آمریکا) در دمای ۳۷°C در انکوباتور ۵٪ CO<sub>2</sub> 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<sup>۲</sup> شستشو داده شدند. برای جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک و از همدیگر، 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 تریپان 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>۳</sup>

(Merk، آلمان) به عنوان حلال برای تهیه محلول پایه سیلیبینین با مولاریته ۴۴/۸۲ استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از این مرحله، محیط حاوی دارو دور ریخته شده و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT<sup>۴</sup> (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 اندازه‌گیری شد. نتایج با مقایسه گروه کنترل (سلول‌های بدون تیمار) نرمالیزه شدند. IC<sub>50</sub><sup>۵</sup> سیلیبینین (غلظتی از دارو که قادر به مهار رشد ۵۰ 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

۴۸ 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 (RNAX-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.

<sup>۴</sup> MethylThiazolTetrazolium

<sup>۵</sup> Half Maximal Inhibitory Concentration

<sup>۱</sup> Fetal Bovine Serum

<sup>۲</sup> Phosphate Buffer Saline

<sup>۳</sup> Dimethyl Sulfoxide

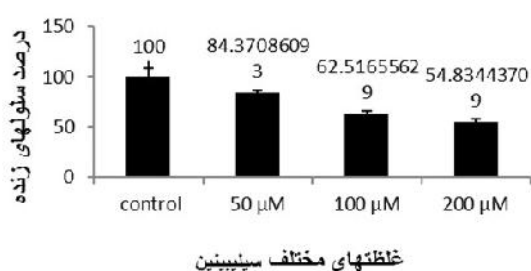
### Real time – PCR

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

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.

جدول ۱. توالی پرایمر ژنهای مورد استفاده

ژن	توالی پرایمر ژن‌ها (5' to 3')
P21	'GCTTCATGCCAGCTACTTCC 3'F 5 'CCCTTCAAAGTGCCATCTGT 3'R 5
-actin	'GGCACCCAGCACAAATGAAGA 3'5 F 'CGACTGCTGTACCTTCACC 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

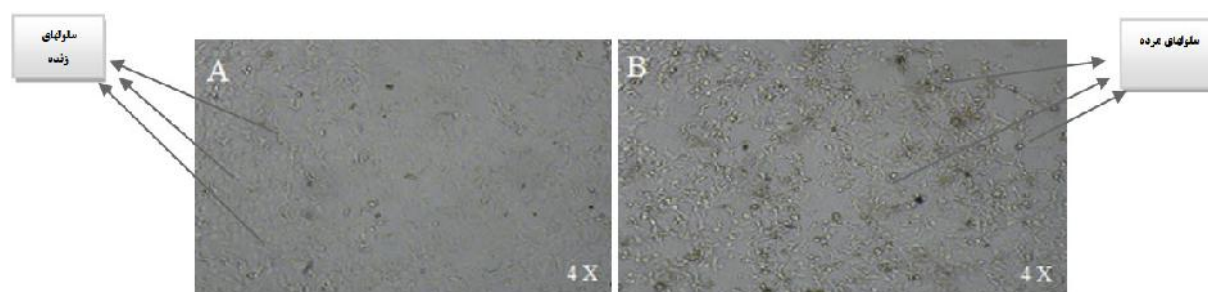
نتایج مورفولوژیک سلولهای تیمارشده در پلیت ۶ خانه‌ای به منظور انجام Real-time PCR مشاهده می‌شود، بدین صورت که شکل سلولها پس از مواجهه با دارو در مقایسه با گروه کنترل بدون دریافت دارو تغییر یافته است (شکل ۱).

### 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 معنی‌دار بودن مهار رشد سلولها در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

### یافته‌ها

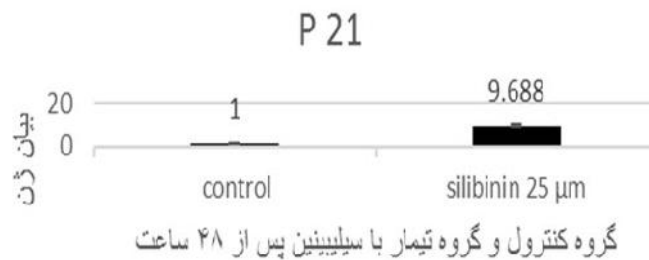
#### تأثیر سیلیبینین بر مهار رشد و تقسیم سلولی



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

**نتایج Real Time – PCR: بررسی بیان ژن P21**  
 بیان ژن p21 در گروه تیمار شده 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

از نرمالیزه شدن با ژن بتا اکتین و محاسبه به روش  $2^{-Ct}$  به مقدار ۹/۶۸۸ برابر بصورت Relative Expression نسبت به نمونه کنترل بدون تیمار، برآورد شد (نمودار ۲).



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

#### بحث

امروزه دستیابی به درمان سرطان یکی از دغدغه‌های عمده پژوهشگران در زمینه پزشکی 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 تخمدان، نیاز به تحقیق و پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد.

در طول سه دهه گذشته، بقاء ۵ ساله برای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان تا ۴۵-۳۷٪ افزایش یافته است که این عامل مربوط به بهره بردن از جراحی برداشت تومور و شیمی درمانی ترکیبی به وسیله پلاتین و پکلی تاکسل می‌باشد [۲۰]. علی رغم اثرات مفید 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 نوروپاتی محیطی نیز همراه بوده است [۲۴]. بنابراین تلاش برای یافتن یک

ترکیب جدید با منشأ کاملاً گیاهی و کم خطر، توجه محققین را بیش از پیش به خود جلب کرده است. سیلیبینین نوعی فلاونوئید (ترکیب فنولداری) است، فلاونوئیدها از جمله تنظیم‌کننده‌های فیزیولوژیکی محسوب می‌شوند که در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند؛ سیلیبینین ماده موثر گیاه خارمریم 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 Catenin, Bcl2, p21/Cip1, Kip1/p27, MAPK/ERK, STAT3, COX-2/PGE2 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

باعث افزایش در بیان ژن P21 بصورت وابسته به دوز می‌باشد [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 D3، E1 و تعدادی از کینازهای وابسته به سایکلین‌ها همراه بود [۲۹]. نتایج به دست آمده ضمن تأیید 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 می‌کند.

#### 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 می‌باشد، به صورت افزایش یافته پس از تیمار با این دارو مشاهده شد. این داده‌ها ضمن تأیید پژوهش‌های پیشین، سیلیبینین را به عنوان یک رژیم درمانی جدید پیشنهاد می‌کند، همچنین مطالعات بیشتر در زمان‌های مختلف جهت بررسی مکانیسم و استفاده از این ترکیب جدید بر روی مدل حیوانی ضروری به نظر می‌رسد.

SKOV-3 اثر کشندگی دارد (IC50 سیلیبینین ۱۹۹/۵ میکرومولار). در مطالعه‌ای همسو با این بررسی که در سال ۲۰۰۳ انجام یافته بود، تأثیر مهار سیلیبینین بر روی رده‌های سلولی (SCLC) SHP-77 و A-549 (NSCLC) به صورت وابسته به غلظت در مهار رشد و مرگ سلولی گزارش شد [۲۶]. در مطالعه‌ای همسو با این بررسی افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی MCF-7 پستان 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 مهار بالقوه در رشد سلول‌های رده MCF-7 داشته و باعث افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود. 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 افزایش 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 برنامه‌ریزی 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 همچنین در توقف فاز G2/M، نشان داد که سیلیبینین

#### References

- 1- Piek JM, van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 622:79-87.
- 2- 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.
- 3- 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.
- 4- 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, Bonome 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 at11q13.5-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.