

بررسی اثر سایتوتوکسیک سیلی مارین بر رده سلولی 4T1 استخراج شده از تومورهای پستانی موش BALB/c

سید محمدعلی شریعت‌زاده^۱، احمد همتا^۲، ملک سلیمانی مهرنجانی^۳، حسن فلاح حسینی^۴، سپیده سماوات^{۵*}

- ۱- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 - ۴- دانشیار پژوهش، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
 - ۵- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران
- *آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
صندوق پستی: ۳۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶، تلفن: ۴۱۷۳۴۰۱ (۰۸۶۱)، نمابر: ۴۱۷۳۴۰۹ (۰۸۶۱)
پست الکترونیک: sepidehsamavat@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۲/۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۸

چکیده

مقدمه: امروزه افزایش چشمگیری برای شناسایی ترکیبات مؤثر در پیشگیری و درمان بیماری سرطان وجود دارد. سیلی مارین ترکیب فلاونوئیدی مشتق شده از گیاه خارمریم است که به عنوان یک داروی شناخته شده در درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی مورد توجه محققان در درمان بیماری سرطان است.

هدف: بررسی اثر سایتوتوکسیک سیلی مارین بر رده سلولی 4T1 و مقایسه آن با داروی شیمی درمانی تاکسول.

روش بررسی: سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلی مارین (۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵) و تاکسول (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵) در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت به طور جداگانه قرار گرفتند. تیمار ترکیبی هم به شکل متناظر انجام گرفت. توانایی حیات سلول‌ها با دو روش تریپان بلو و MTT ارزیابی و برای بررسی مورفولوژی هسته، رنگ‌آمیزی با هوخست و PI انجام شد.

نتایج: سیلی مارین و تاکسول به صورت وابسته به دوز و زمان به طور معنی‌داری موجب کاهش قابلیت حیات سلول‌های سرطانی پستان موش شدند. به علاوه تغییرات مورفولوژیک مربوط به آپوپتوز به طور مشابه در هر دو تیمار مشاهده شد. در تیمار ترکیبی سیلی مارین و تاکسول، سیلی مارین باعث افزایش حساسیت سلول‌های 4T1 به تاکسول شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک سیلی مارین روی سلول‌های سرطانی موش قابل مقایسه با داروی تاکسول بود. استفاده هم‌زمان سیلی مارین و تاکسول اثرات سایتوتوکسیک تاکسول را افزایش داد.

کل واژگان: تاکسول، سایتوتوکسیک، سیلی مارین، رده سلولی 4T1



مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان سراسر دنیاست، به طوری که سالانه حدود یک میلیون مورد جدید از این بیماری در دنیا تشخیص داده می‌شود [۱]. در ایران نیز این سرطان، شایع‌ترین بدخیمی زنان محسوب می‌شود و ۲۴/۴ درصد بدخیمی‌های شناسایی شده در زنان را تشکیل می‌دهد [۲]. میزان شیوع سرطان پستان در زنان ایرانی بالای ۳۰ سال، ۲۲ در ۱۰۰۰۰۰ است [۳]. میانگین سنی مبتلایان به این سرطان در ایران ۴۸/۸ سال است و حداکثر فراوانی آن در گروه ۴۹ - ۴۰ سال مشاهده می‌شود، بنابراین سرطان پستان در بیماران ایرانی یک دهه زودتر از هم‌تایان مبتلای آنها در جوامع غربی بروز می‌کند که اشاره به تفاوت‌هایی در روند ایجاد یا پیشرفت آن در بیماران ایرانی نسبت به سایر جوامع دارد [۴]. تاکسول (C47H51NO14, MW=853/93) یک عامل آنتی‌نئوپلازی است که از گیاه جنس سرخدار استخراج می‌شود و برای درمان طیف وسیعی از انواع تومورها بخصوص سرطان تخمدان مقاوم به درمان، سرطان سینه و سرطان ریه (non-small cell) مورد استفاده قرار می‌گیرد [۵].

تحقیقات در سه دهه اخیر ثابت کرده است که رژیم‌های غنی از میوه و سبزیجات می‌تواند بر علیه خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها مؤثر باشد. اخیراً گیاهان دارویی مختلف به علت طیف وسیع اثرات فارماکولوژیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۶]. مطالعات نشان داده است که خاصیت آنتی توموری داروهای ضد سرطان می‌تواند با ترکیب آنها با مشتقات گیاهی افزایش و عوارض جانبی آنها کاهش یابد [۷].

گیاه خارمریم از تیره کاسنی با نام علمی *Silybum marianum* و نام انگلیسی Milk thistle واجد کمپلکسی به نام سیلی‌مارین می‌باشد که از خاصیت دارویی فوق‌العاده‌ای برخوردار است. این گیاه رویش جهانی داشته و بومی ایران نیز می‌باشد. مصرف این گیاه در طب سنتی اروپا، چین، هند و تحقیقات طب مدرن جایگاه بسیار مهمی دارد. سیلی‌مارین یا عصاره تام بذر گیاه خارمریم یک ترکیب فلاونوئیدی پلی‌فنلی است که به طور عمده از سیلی‌بینین و مقدار کمی از ترکیبات

دیگر از جمله دهیدروسیلیبین، ایزوسیلیبین، سیلی‌کرسیتین و سیلی‌دیانین تشکیل شده است [۸، ۹].

امروزه به عنوان یک داروی مؤثر در پیشگیری و بهبود بیماری‌ها و اختلالات کبدی و مسمومیت کبدی ناشی از سموم قارچ کشنده کلاه‌دار مورد استفاده می‌باشد به علاوه سیلی‌مارین سلول‌های کبدی را در برابر حلال‌ها و مواد شیمیایی محافظت می‌کند [۱۰].

در مطالعاتی که در زمینه اثرات سیلی‌مارین بر رده‌های مختلف سلولی انجام شده است، مشاهده کرده‌اند که اثرات این ترکیب و همچنین مسیرهایی که از آن طریق اثرات خود را اعمال می‌کنند در رده‌های سلولی مختلف متفاوت است و همچنین رفتار این ترکیبات در سلول‌های سالم و سرطانی یکسان نیست [۱۱]. در نتیجه در این مطالعه بر آن شدید تا تأثیر سیلی‌مارین بر رده سلولی 4T1 استخراج شده از تومورهای پستانی موش را بررسی نماییم و به این سوال پاسخ دهیم که آیا در تیمار ترکیبی، سیلی‌مارین می‌تواند تأثیر تاکسول بر این رده سلولی را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی 4T1 از انستیتو پاستور ایران خریداری و پس از دفریز کردن سلول‌ها در محیط کشت کامل شامل ۱۶۴۰-RPMI با ۱۰ درصد FBS، پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) تحت شرایط استاندارد کشت (دی اکسید کربن ۵ درصد - رطوبت ۹۵ درصد - دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شدند.

سیلی‌مارین (C₂₅H₂₂O₁₀ 2 H₂O, MW=482.4 g/mol) از Sigma Aldrich co. خریداری شد. غلظت‌های سیلی‌مارین برای آزمایش‌های *in vitro* بر طبق مطالعات پیشین انتخاب شده است [۱۲، ۱۳] که عبارتند از:

۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیلی‌مارین در DMSO حل و تمام رقیق‌سازی‌های بعدی با RPMI انجام شد. سلول‌ها در خانه‌های کنترل تحت تیمار با DMSO قرار

گذاشتن در فرمول زیر به صورت درصد بیان شد. برای هر نمونه ۳ بار تکرار در نظر گرفته شد. در این روش، سلول‌های مرده به علت نفوذپذیری به تریپان بلو، به رنگ آبی دیده شد [۲۰]. در واقع غشای سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ‌های غیرالکترولیت را به درون سلول نمی‌دهند، اما سلول‌های مرده به خوبی رنگ می‌گیرند [۲۱].

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} = \text{توانایی زیستی سلول ها}$$

رنگ‌آمیزی MTT

اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نامحلول فورمازان است. هرچه تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود (و برعکس). برای انجام این تست تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دو بار توسط PBS شسته شد. سپس به هر چاهک پلیت ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی غلظت‌های متفاوت سیلی‌مارین و تاکسول به طور جداگانه و سپس به شکل ترکیبی اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ و ۴۸ و ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد. به منظور بررسی اثر کاهنده و یا افزایش سیلی‌مارین بر سایتوتوکسیسیته القا شده توسط تاکسول، سلول‌ها به صورت هم زمان و با دوزهای متناظر (دوزهای $1/25 + 25$ ، $2/5 + 50$ ، $5 + 75$ ، $10 + 100$ و $20 + 125$) تحت تیمار ترکیبی قرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان تیمار محیط هر چاهک با 100 میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین شد. به هریک از چاهک‌ها 10 میکرولیتر محلول MTT (Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide) (سیگما، آلمان) با غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه و به مدت 4 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان 100 میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت

گرفتند، غلظت نهایی DMSO در خانه‌های کنترل برابر با خانه‌های تست بود [۱۴].

غلظت‌های مورد استفاده تاکسول (stragen pharma، سوئیس) نیز بر اساس مطالعات پیشین انتخاب شده است [۱۶، ۱۵] که عبارتند از: 20 ، 10 ، 5 ، $2/5$ ، $1/25$ نانو مولار.

بررسی قابلیت حیات سلول‌ها

سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها با روش‌های مختلفی انجام می‌شود، از آن جمله روش تریپان بلو [۱۷] است که روشی مناسب برای ارزیابی یکپارچگی غشای سلول‌ها و در نتیجه تکثیر یا مرگ آنها می‌باشد. روش دقیق دیگری که معمولاً برای بررسی بقای سلول‌ها به کار می‌رود، استفاده از نمک زرد رنگ تترازولیوم (MTT assay) است که این نمک به وسیله سلول‌های زنده جذب و سبب تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فورمازان می‌شود [۱۸، ۱۹]. این کریستال‌ها در خارج از سلول با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روش‌های طیف‌سنجی قابل سنجش و اندازه‌گیری است. برای هر سلولی یک رابطه خطی میان تعداد سلول‌های زنده و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هر گونه تغییراتی را در میزان تکثیر سلول‌ها فراهم می‌سازد.

رنگ‌آمیزی تریپان بلو

سلول‌های 4T1 با تراکم 50000 سلول برای هر چاهک پلیت ۱۲ خانه در نظر گرفته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلی‌مارین و تاکسول قرار گرفتند. بعد از گذشت دوره تیمار (24 ، 48 ، 72 ساعت) سلول‌ها با PBS شسته شده و با Trypsin/EDTA جدا و پس از سانتریفوژ با دور 2500 rpm به مدت 5 دقیقه، رسوب سلولی با محیط کشت تازه به حجم یک میلی‌لیتر رسید. سپس مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاصل با حجم مساوی از تریپان بلو (Sigma company, Germany) مخلوط و به مدت 2 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تعداد سلول‌های زنده و مرده با لام هموسایتومتر بررسی و پس از



شد. جهت مقایسه گروه تیمار ترکیبی نسبت به تاکسول نیز از t test استفاده شد.

نتایج

نتایج اثر غلظت‌های مختلف سیلی‌مارین و تاکسول در زمان‌های مختلف (۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت) بر روی رده سلولی 4T1 به روش تریپان بلو در سه بازه زمانی و در ۶ غلظت در جدول شماره‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. آنالیز واریانس دو طرفه داده‌های به دست آمده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو نشان داد که اثر متقابل دوز مصرفی سیلی‌مارین و تاکسول و زمان تیمار باعث کاهش معنی‌دار قدرت زیستی سلول‌های 4T1 می‌شود.

مقایسه داده‌ها در روش آنالیز واریانس یک طرفه در دوزها برای زمان‌های مختلف نشان داد که میانگین قدرت حیات سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد. علاوه بر این آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با روش تترازولیم (MTT) نیز نشان داد که کاهش قدرت زیستی سلول‌های 4T1 نیز وابسته به دوز و زمان تیمار بوده است (جدول شماره‌های ۳ و ۴). نتایج به دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تأیید نمودند.

نتایج حاصل از تیمار ترکیبی در مقایسه با تاکسول به روش MTT به شکل نمودار در سه زمان نشان داده شده است (نمودار شماره ۱). در ۲۴ ساعت تا تیمار ترکیبی ۵ + ۷۵ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تاکسول مشاهده نشد، اما در دو تیمار ترکیبی ۱۰ + ۱۰۰ و ۲۰ + ۱۲۵ نسبت به تاکسول تفاوت معنی‌دار وجود داشت. در ۴۸ و ۷۲ ساعت همه‌ی گروه‌های تیمار ترکیبی نسبت به تاکسول تفاوت معنی‌دار داشتند. سیلی‌مارین حساسیت سلول‌های سرطانی 4T1 به تاکسول را افزایش داده است و در نتیجه قابلیت حیات سلول‌ها در تیمار ترکیبی در مقایسه با تاکسول به تنهایی بیشتر کاهش پیدا کرده است.

۲ ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک از پلیت به یک چاهک دیگر منتقل و جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA-reader ثبت و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر در مورد هر غلظت محاسبه شد:

$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times 100$$

آنالیز تغییرات مورفولوژیک

به دنبال تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلی‌مارین و ۲۰ نانو مولار تاکسول به مدت ۴۸ ساعت، مورفولوژی هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ هوخست در دمای اتاق بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکی مورد مطالعه قرار گرفت. هوخست یک رنگ فلورسنت است که از طریق غشای پلاسمایی سالم به سلول‌ها نفوذ می‌کند و DNA را رنگ می‌کند تا تغییرات مورفولوژی هسته مثل متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن قابل بررسی باشد [۲۲]. رنگ‌آمیزی هم‌زمان سلول‌ها با هوخست و پروپیدیم آیداید به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق برای تشخیص سلول‌های زنده از سلول‌های مرده انجام شد. پروپیدیم آیداید هم یک رنگ فلورسنت متصل شونده به نوکلئیک اسید است که نمی‌تواند به غشای سلول‌های زنده نفوذ کند اما بعد از دست دادن سلامت غشا وارد سلول می‌شود [۲۳]. سلول‌های رنگ شده ۲ بار با PBS شسته شد و فوراً توسط میکروسکوپ فلورسنتس عکس‌برداری انجام شد. در نهایت سلول‌های زنده به رنگ آبی و سلول‌های مرده به رنگ قرمز قابل شناسایی‌اند.

آنالیز آماری داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزار SPSS برای تعیین اثر متقابل دوز و زمان تیمار بر قدرت زیستی سلول‌ها از روش آنالیز واریانس دو طرفه (two-way ANOVA) و برای مقایسه تفاوت میانگین قابلیت حیات سلول‌ها در دوزها و زمان‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (one way-ANOVA) استفاده شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته



جدول شماره ۱- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش تریپان بلو و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حروف متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a داده‌های مربوط به دوز صفر (گروه کنترل) است. داده‌های گروه تیمار که با حرف a مشخص شده‌اند از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارند. b, c, d, e, f همگی در یک ستون با داده‌های کنترل و گروه‌های دیگر که کد حروف آنها با هم مختلف است تفاوت معنی‌دار دارند. (One and Two Way ANOVA, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز ($\mu\text{g/ml}$)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0.001	$84/39^a \pm 2/33$	$87/59^a \pm 2/17$	$91/25^a \pm 3/70$	۰
	$67/11^b \pm 5/16$	$63/81^b \pm 3/57$	$89/04^a \pm 4/21$	۲۵
	$54/93^c \pm 4/48$	$62/41^c \pm 3/91$	$70/32^b \pm 3/50$	۵۰
	$42/02^d \pm 6/76$	$53/5^d \pm 4/64$	$57/14^c \pm 4/12$	۷۵
	$21/11^e \pm 4/04$	$36/11^e \pm 5/96$	$42/24^d \pm 2/89$	۱۰۰
	$10/83^f \pm 3/19$	$23/58^f \pm 2/71$	$35/62^e \pm 5/14$	۱۲۵
0.001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0.001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش تریپان بلو و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حروف متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a داده‌های مربوط به دوز صفر (گروه کنترل) است. داده‌های گروه تیمار که با حرف a مشخص شده‌اند از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارند. b, c, d همگی در یک ستون با داده‌های کنترل و گروه‌های دیگر که کد حروف آنها با هم مختلف است تفاوت معنی‌دار دارند. ab, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا a دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. bc, این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا c دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. (One and Two Way ANOVA, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز (nM)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0.001	$88/23^a \pm 3/01$	$92/09^a \pm 1/54$	$98/23^a \pm 1/64$	۰
	$84/72^a \pm 6/57$	$89/82^a \pm 4/25$	$96/51^a \pm 2/35$	۱/۲۵
	$81/17^{ab} \pm 4/03$	$87/43^a \pm 3/75$	$93/02^a \pm 4/81$	۲/۵
	$72/77^{bc} \pm 3/40$	$83/5^a \pm 5/01$	$89/35^a \pm 3/50$	۵
	$65/04^c \pm 2/09$	$72/19^b \pm 1/09$	$76/16^b \pm 6/12$	۱۰
	$40/64^d \pm 2/89$	$60/33^c \pm 6/13$	$69/4^b \pm 3/07$	۲۰
0.001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0.001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.



جدول شماره ۳- مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف سیلی‌مارین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت که به روش جذب MTT اندازه‌گیری شده است. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حروف متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a داده‌های مربوط به دوز صفر (گروه کنترل) است. داده‌های گروه تیمار که با حرف a مشخص شده‌اند از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارند. b، c، d، e و f همگی در یک ستون با داده‌های کنترل و گروه‌های دیگر که کد حروف آنها با هم مختلف است تفاوت معنی‌دار دارند. (One and Tow Way ANOVA, Tukey test)

P-Value	زمان (ساعت)			دوز (µg/ml)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0/001	$100^a \pm 0/00$	$100^a \pm 0/00$	$100^a \pm 0/00$	۰
	$64/51^b \pm 2/11$	$75/98^b \pm 1/36$	$82/85^b \pm 3/85$	۲۵
	$48/59^c \pm 1/33$	$57/54^c \pm 2/17$	$62/42^c \pm 2/22$	۵۰
	$30/07^d \pm 2/06$	$48/02^d \pm 3/39$	$54/14^d \pm 0/88$	۷۵
	$8/88^e \pm 0/58$	$29/10^e \pm 1/10$	$36/93^e \pm 1/35$	۱۰۰
	$1/25^f \pm 0/84$	$18/37^f \pm 3/02$	$32/81^e \pm 0/40$	۱۲۵
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

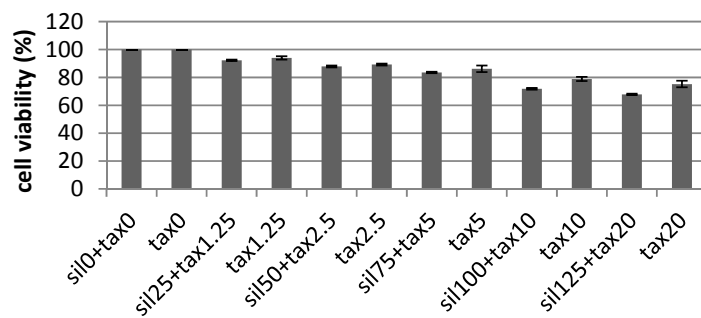
* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.

جدول شماره ۴- مقایسه میانگین درصد توان زیستی سلول‌های سرطانی پس از تیمار با دوزهای مختلف تاکسول در زمان‌های متفاوت، با روش سنجش MTT و اثر متقابل زمان و دوز. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در هر ستون میانگین‌هایی که با کد حروف متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. a داده‌های مربوط به دوز صفر (گروه کنترل) است. داده‌های گروه تیمار که با حرف a مشخص شده‌اند از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار ندارند. b، c، d، e و f همگی در یک ستون با داده‌های کنترل و گروه‌های دیگر که کد حروف آنها با هم مختلف است تفاوت معنی‌دار دارند. ab، این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا a دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. bc، این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف b یا c دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. cd، این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف d یا c دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. de، این داده‌ها به جز با داده‌هایی که حروف d یا e دارند با کلیه داده‌های دیگر که کد حروف دیگر دارند از نظر آماری معنی‌دار هستند. (One and Tow Way ANOVA, Tukey test)

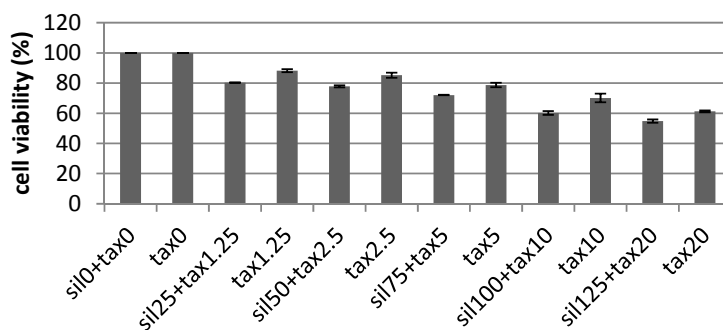
P-Value	زمان (ساعت)			دوز (nM)
	۷۲	۴۸	۲۴	
0/001	$100^a \pm 0/00$	$100^a \pm 0/00$	$100^a \pm 0/00$	۰
	$81/23^b \pm 2/03$	$88/19^b \pm 1/75$	$94/01^b \pm 2/13$	۱/۲۵
	$78/87^{bc} \pm 2/58$	$85/20^{bc} \pm 2/87$	$89/23^{bc} \pm 1/07$	۲/۵
	$72/31^c \pm 1/59$	$78/72^c \pm 2/52$	$86/01^{cd} \pm 4/03$	۵
	$60/31^d \pm 3/48$	$70/09^d \pm 5/00$	$78/91^{de} \pm 2/60$	۱۰
	$49/28^e \pm 4/52$	$61/22^e \pm 1/07$	$75/21^e \pm 4/01$	۲۰
0/001	* اثر متقابل زمان و دوز			

* اثر متقابل دوز و زمان در سطح $p < 0/001$ موجب کاهش توانایی حیات سلول‌ها می‌شود.

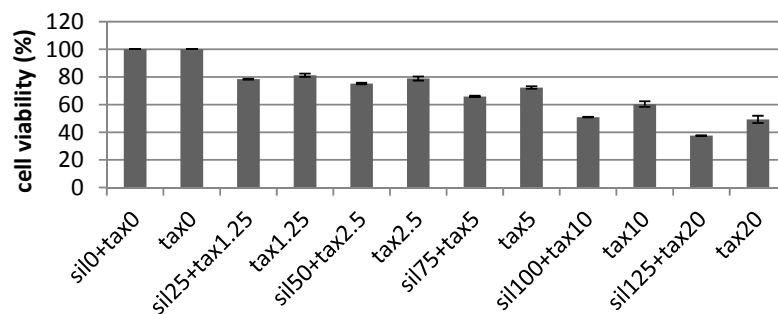




a) treatment



b) treatment



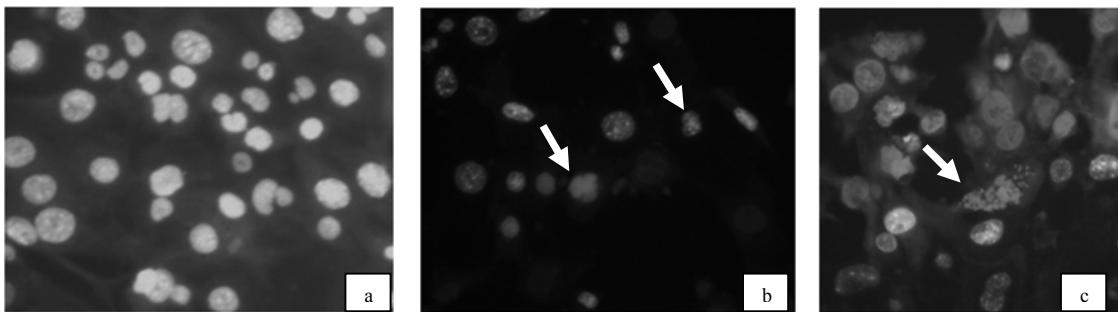
c) treatment

نمودار شماره ۱ - نمودارهای مقایسه میانگین درصد توانایی زیستی سلول‌های سرطانی تیمار شده با سیلی‌مارین (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ $\mu\text{g/ml}$) و تاکسول نسبت به تاکسول (۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ nM) به روش جذب MTT. (a) تیمار ۲۴ ساعت. (b) تیمار ۴۸ ساعت. (c) تیمار ۷۲ ساعت. (t test, $p < 0.05$).

متراکم شدن و تغییر شکل هسته در مقایسه با گروه کنترل بود. رنگ‌آمیزی پروپیدیم آیوداید افزایش تخریب غشاء و مرگ سلول‌ها در مقایسه با کنترل را نشان داد (شکل شماره ۱).

تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها پس از تیمار با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلی‌مارین و دوز ۲۰ نانومولار در مدت زمان ۴۸ ساعت با استفاده از رنگ فلوروسنت هوخست شامل





شکل شماره ۱- رنگ آمیزی فلورسنت سلول‌های سرطانی رده 4T1 تیمار شده با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلی‌مارین و ۲۰ نانومولار تاکسول برای مدت زمان ۴۸ ساعت. (a) سلول‌های کنترل رنگ‌آمیزی شده با هوست با سیلی‌مارین رنگ‌آمیزی همزمان با هوست و پروپیدیوم ایویداید نشان‌دهنده سلول‌های زنده (آبی) و سلول‌های مرده (قرمز) (c) سلول‌های تیمار شده با تاکسول رنگ‌آمیزی همزمان با هوست و پروپیدیوم ایویداید نشان‌دهنده فروپاشی و متراکم شدن هسته‌ها

بحث

[۱۳] ولی در مواردی نیز مانند سرطان روده کوچک این داروی

گیاهی بی‌اثر بوده است [۲۵].

مکانیسم‌های متعددی برای اثر سیلی‌مارین در مهار رشد سلول سرطانی پیشنهاد شده است. گزارش تحقیقات حاکی از آن است که سیلی‌مارین موجب مهار کوپی‌سازی در سلول سرطانی، مهار تحریک‌کننده سلولی، اختلال در انتقال پیام سلولی، مهار اثر التهابی و همچنین موجب تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تنظیم چرخه سلولی می‌شود [۳۰، ۲۹]. در کشت سلولی سرطان پروستات سیلی‌مارین عامل رشد و پیام سلولی که موجب تحریک رشد سلولی می‌شود را مهار، چرخه سلولی را متوقف و فعالیت سلولی که موجب مهار فاگوسیت سلول سرطانی می‌شود را متوقف نموده است [۳۱]. به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی این ماده، این نگرانی وجود دارد که این گیاه در تثبیت عمل سیتوتوکسیتی داروهای کموتراپی که از طریق مسیرهای بیوشیمیایی پراکسیداتیو عمل می‌کنند اختلال ایجاد کند، اما در سلول‌های سرطانی پستان و تخمدان در انسان سیلی‌بین باعث تشدید اثرات سیتوتوکسیک سیس‌پلاتین و دوکسوروبیسین می‌شود و هیچ‌گونه شواهدی دال بر تداخل با اثر سیتوتوکسیتی آنها دیده نشده است [۳۲]. سیلی‌بین حساسیت سلول‌های سرطانی پروستات مقاوم در برابر شیمی‌درمانی را به داروهای ضد سرطان افزایش می‌دهد [۲۸، ۲۷، ۲۶]. نتایج مطالعه حاضر اثرات هم‌افزایی سیلی‌مارین بر تاکسول را در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱، به منظور بررسی

بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو آزمون رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT نشان داد که سیلی‌مارین و تاکسول موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی شدند. با افزایش غلظت و زمان میزان مرگ و میر سلول‌های سرطانی 4T1 افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده از هر دو آزمون در یک راستا بوده و یکدیگر را تأیید نمودند. تحقیقات انجام گرفته نشان داد که سیلی‌مارین قدرت زیستی سلول‌های MDA-MB 468 را با الگوی وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد [۱۳] که در تأیید نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

تغییرات مورفولوژی مشاهده شده در سلول‌های 4T1 تیمار شده با تاکسول و سیلی‌مارین احتمالاً بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) بوده که نیاز به تحقیق بیشتر می‌باشد. با در نظر گرفتن فرایند فعال‌سازی آنزیم‌های کاسپاز در سلول‌هایی که تحت تیمار با تاکسول [۱۵] یا سیلی‌مارین [۲۴] قرار می‌گیرند و نقش این آنزیم در شکستگی ژنوم سلول، این فعالیت آنزیمی ممکن است عامل تغییر شکل و متراکم شدن هسته سلول‌های تیمار شده باشد.

اثر ضدسرطانی مشاهده شده توسط سیلی‌مارین در تحقیق حاضر در راستای گزارش‌های قبلی مبنی بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات، سرطان پستان، کبد، اپیدرم، کولون، تخمدان، لمفوهای هیستوسیتیک و لوسمی بوده است

تجویز داروهای ضد سرطان و همچنین تشدید اثر درمانی آنها مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد سیلی‌مارین اثر مهارى بر توان زیستی سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 دارد و اثر آن بر سلول‌های سرطانی وابسته به دوز و زمان بوده است. همچنین سیلی‌مارین سبب متراکم شدن، فروپاشی و تغییر شکل هسته سلول‌های سرطانی می‌شود که وجود این تغییرات از پیامدهای آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌باشد. در تیمار ترکیبی سیلی‌مارین باعث سینرژیک اثر تاکسول بر رده سلولی سرطان پستان شد. با توجه به اثرات ضد سرطانی مشاهده شده در این مطالعه پیشنهاد می‌شود که اثر ضد سرطانی در *in vivo* روی موش صحرایی بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی جهت همکاری در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایم.

فعالیت شیمی‌درمانی سیلی‌مارین در ترکیب با دوکسورابیسین و تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی کولون انجام گرفت را تأیید می‌کند. در این مطالعه دو رده سلولی سرطان کولون (یکی حساس به دوکسورابیسین و دیگری مقاوم به درمان) ابتدا تحت تیمار با سیلی‌مارین و سپس تحت تیمار با داروهای دیگر قرار گرفتند. پیشنهاد می‌کنند، می‌توان از غلظت‌های پایین سیلی‌مارین برای سینرژیک اثر داروهای شیمی‌درمانی در تومورهای حساس به درمان بهره برد و یا می‌توان از ویژگی ضد تکثیر سیلی‌مارین در غلظت‌های بالاتر به تنهایی یا در ترکیب با داروهای دیگر برای تومورهای مقاوم به درمان بهره برد. در پایان هم پیش‌درمانی با سیلی‌مارین را به عنوان یک پیشنهاد ارزشمند برای درمان‌های ترکیبی مطرح می‌کند [۱۲].

مطالعه حاضر نشان داد که در تیمار ترکیبی سیلی‌مارین توانست حساسیت سلول‌های 4T1 به تاکسول را افزایش دهد و اثرات سیتوتوکسیک تاکسول را در سطح معنی‌داری افزایش دهد. شاید بتوان این افزایش حساسیت سلول‌ها به تاکسول را به ویژگی منحصر به فرد سیلی‌مارین به عنوان مهارکننده پمپ P-glycoprotein نسبت داد. فعالیت P-gp در برخی سلول‌های سرطانی تحت شیمی‌درمانی افزایش یافته و این پمپ داروهای ضدسرطانی هیدروفوب (مثل تاکسول) را به خارج سلول پمپ کرده و مانع اثر آنها می‌شود [۳۳]. این اثر نوید آن را می‌دهد که سیلی‌مارین در کاهش عوارض ناشی از

منابع

1. Bray F, Mc Carron P and Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (6): 229 - 39.
2. Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR and Khademi H. Five common cancers in Iran. *Arch. Iran Med.* 2010; 13 (2): 143 - 6.
3. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M and Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J.* 2007; 13 (4): 383 - 91.
4. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A and Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2004; 5 (1): 24 - 7.
5. Park J H, Hur H J, Woo J S and Lee H J, Effects of silymarin and formulation on the oral bioavailability of paclitaxel in rats. *European J. Pharmaceutical Sci.* 2012; 45: 296 - 301.
6. Ramasamy K and Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin minireview. *Cancer Letters* 2008; 269: 352 - 62.



7. D'Incalci M, Steward WP and Gescher AJ. Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 899 - 904.
8. Gazák R, Walterová D and Kren V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14 (3): 315 - 38.
9. Deep G, Singh RP, Agarwal C, Kroll DJ and 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 flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene* 2006; 25 (7): 1053 - 69.
10. El-Sherbinya I M, Abdel-Mogibb M and Dawidarb M. Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin. *Carbohydrate Polymers* 2011; 83: 1345 - 54.
11. Jamshidi A, Ahmadi Ashtiani HR, Oliazadeh N, Jafarzadrh N, Taheri Brojerdi M and Naderi M. A key for thousands locks. *Noaavar Press* 2007; 70 - 87.
12. Colombo V, Lupi M, Falcetta F, Forestieri D, D'Incalci M and Ubezio P. Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; 67: 369 - 79.
13. Zi X, Feyes DK and Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 1055 - 64.
14. Alidoost F, Gharagozloo M, Bagherpour B, Jafarian A, Sajjadi S E, Hourfar H and Moayedi B. Effects of silymarin on the proliferation and glutathione levels of peripheral blood mononuclear cells from β -thalassemia major patients. *International Immunopharmacol.* 2006; 6: 1305 - 10.
15. Panno ML, Giordano F and Mastroianni F. Evidence that low doses of Taxol enhance the functional transactivatory properties of p53 on p21 waf promoter in MCF-7 breast cancer cells. *FEBS Letters* 2006; 580: 2371 - 80.
16. Tokalov S V and Abolmaali N D. Protection of p53 wild type cells from taxol by nutlin-3 in the combined lung cancer treatment. *BMC Cancer* 2010; 10: 57 - 64.
17. Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S and Packer L. Trypan blue dye exclusion method. *Meth. Enzym.* 1978; 52: 60 - 71.
18. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O and Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44 (11): 1957 - 62.
19. Francis D and Rapid RL. Colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* 1986; 89: 271 - 77.
20. Abnosi M H and Jafari Yazdi Z. Low Dose and Long Term Toxicity of Sodium Arsenite Caused Caspase Dependent Apoptosis Based on Morphology and Biochemical Character. *Cell J.* 2012; 14 (3): 161 - 70.
21. Shokrgozar MA, Zali H, Rezaei-Tavirani M and Amanzadeh A. Comparison of two Staining Assays: Trypan blue and MTT in vitro Evaluation of Human Calprotectin Proliferation Inhibition on Human Gastric Cancer Cells. *Kosar Medical J.* 2007; 12 (2): 127 - 37.
22. Yao G, Ling L, Luan J, Ye D and Zhu P. Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7: 444 - 53.
23. Gong Y, and Han XD. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* 2007; 22: 623 - 30.



24. Santosh K. Katiyar, Anshu M. Roy and Manjeshwar S. Baliga. p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome *c* Silymarin induces apoptosis primarily through a release, and caspase activation. *Mol. Cancer Ther.* 2005; 4: 207 - 16.
25. Gershbein LL. Action of dietary trypsin, pressed coffee oil, silymarin and iron salt on 1,2-dimethylhydrazine tumorigenesis by gavage. *Anticancer Res.* 1994; 12: 111 - 18.
26. Dhanalakshmi S, Agarwal P, Glode LM and Agarwal R. Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin- and carboplatin-induced growth inhibition and apoptotic death. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 699 - 705.
27. Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC and Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol. Rep.* 2004; 11: 493 - 99.
28. Tyagi AK, Singh RP, Agarwal C, Chan DC and Agarwal R. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth Inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3512 - 19.
29. Vinh PQ, Sugie S and Tanaka T. Chemopreventive effects on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 2002; 93 (1): 42 - 9.
30. Singh RP and Agarwal R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. *Antioxid. Redox. Signal.* 2002; 4: 655 - 63.
31. Dhanalakshmi s, singh RP and Agarwal C. Silibinin inhibits constitutive and TNF α -induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNF α -induced apoptosis. *Oncogen.* 2002; 21 (11): 1759 - 67.
32. Scambia G, De Vincenzo R, Ranelletti FO, Panici PB, Ferrandina G, D'Agostino G, Fattorossi A, Bombardelli E and Mancuso s. Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. *Eur. J. Cancer* 1996; 32: 877 - 82.
33. Kwon Y J, Jung H J and Lee H J. Study on the mechanism of P-glycoprotein inhibitory activity of silymarin in human breast cancer cell. *J. Kor. Pharm. Sci.* 2006; 36: 315 - 20.



The Cytotoxic Effects of Silymarin on the 4T1 Cell Line Derived from BALB/c Mice Mammary Tumors

Shariatzadeh SMA (Ph.D.)¹, Hamta A (Ph.D.)¹, Soleimani M (Ph.D.)¹, Fallah Huseini H (Ph.D.)², Samavat S (M.Sc.)^{1*}

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

2- Pharmacology & Applied Medicine Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medical Plants, ACECR, Karaj, Iran

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran, 38156-8-8349

Tel: +98-861-4173401, Fax: +98-861-4173409

Email: sepeidhsamavat@gmail.com

Abstract

Background: There is an increasing interest in identifying potent cancer preventive and therapeutic agents. Silymarin is a flavonoids complex extracted from the milk thistle (*Silybum marianum* L.) seeds. Silymarin was found clinically successful in the treatment of various liver diseases. Silymarin is in the focus of cancer researchers due to its high antioxidant properties.

Objective: The present study was aimed to investigate the effect of silymarin on 4T1 cells and compared with taxol.

Methods: 4T1 cell line (BALB/c mouse mammary tumors) was cultured in RPMI medium containing FBS 10%. Cells were incubated with 5% CO₂ in presence of different concentration of silymarin (25-50-75-100-125 µg/ml), taxol (1.25-2.5-5-10-20 nM) and combination of silymarin and taxol separately for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was assessed using trypan blue and MTT staining. The cells morphology was studied using fluorescent dye (Hochest, propidium iodide).

Results: Silymarin and taxol showed significant cytotoxic effects on breast cancer cell in a dose and time dependent manner. Condensation and deformation of the nuclei were also observed similarly for both treatments. In combination treatment silymarin enhanced the sensitivity of 4T1 cells to taxol in all doses.

Conclusion: The cytotoxic effect of silymarin on mouse mammary tumors was comparable to taxol cytotoxicity. Treatment cells with combination of silymarin and taxol improved the cytotoxic effect of taxol.

Keywords: Cytotoxic, Silymarin, Taxol, 4T1 cell line

