مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طب مکمل، شماره۱، بهار ۱۳۹۱

اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه خارمریم بر روی سلول سرطان سینه رده MCF-7

داود بشّاش[1*]، مجید صفا[2]، عاطفه شهبازی[3]، مژده محمدیان[4]، نرگس شاه‌محمد[5]

۱. دکترای تخصصی خون شناسی و بانک خون- دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲. دکترای تخصصی خون شناسی و بانک خون- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، سنندج، ایران.

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد خون شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۵. کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۰۹/۲۸

چکیده

مقدمه: با توجه به شیوع سرطان سینه در ایران، شیب صعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته، میزان مرگ ومیر بالای مبتلایان و از طرفی دیگر با توجه به مصرف خوراکی، ارزان بودن و دسترسی آسان عموم به عصاره گیاه خارمریم (milk thistle)، در این تحقیق برآن شدیم تا اثربخشی این فراورده گیاهی را بر روی سلول سرطان سینه رده MCF-7 بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثر silibinin در سرطان سینه، سلول‌های رده MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلفی از دارو کشت داده شد. از آزمون‌های Microculture Tetrazolium Test، Immunobloting و Quantitative real-time PCR جهت بررسی اثر دارو بر تغییر بیان پروتئین و mRNA ژن‌های Bax و Bc1-2 و همچنین القاء مرگ سلولی استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی میزان بقاء سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که silibinin رشد سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که silibinin میزان بیان mRNA ژن Bax را از نظر آماری به طور معنادار افزایش می‌دهد، در حالی که بر مقدار بیان ژن Bcl-2 تأثیری نداشت. همان طور که با توجه به نتایج real-time PCR انتظار می‌رفت، میزان بیان پروتئین Bax نیز از نظر آماری به طور معنادار افزایش داشت، در صورتی که در مقدار پروتئین Bcl-2 تغییری حاصل نشد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج حاصل از پژوهش انجام شده مؤید اثربخشی این مکمل گیاهی علیه سرطان سینه می‌باشد و با توجه به طبیعی بودن فراورده، هزینه پائین آن و امکان دسترسی عموم، وارد کردن این مکمل گیاهی در رژیم غذایی ممکن است در درمان سرطان سینه مؤثر باشد.

کلید واژه‌ها: سیلیبینین، سرطان سینه، MCF-7 cell، Bax، Bcl-2.

*نویسنده مسئول: Email: David_5980@yahoo.com

مقدمه :

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی نئوپلاستیک زنان در دنیا است و به عنوان مهمترین دلیل مرگ ناشی از سرطان در خانم‌ها مطرح می‌باشد(۱-۲). هر چند که شیوع سالانه این بدخیمی در دنیا روبه افزایش می‌باشد، با این حال میزان شیوع آن در کشورهای دنیا متفاوت گزارش شده است(۳). با وجود آن که بالاترین فراوانی این بدخیمی مربوط به کشورهای توسعه یافته است، اما تحقیقات نشان می‌دهد که شیب افزایش شیوع سرطان سینه در کشورهای در حال توسعه بیشتر بوده و متوسط عمر بیماران مبتلا در این کشورها کمتر می‌باشد(۴). طی مطالعات انجام شده مشخص شده است که میزان شیوع سرطان سینه در کشور ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته کمتراست، اما با این حال، این بدخیمی همچنان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود، از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران حکایت دارد(۵). از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می‌توان به جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد، با این حال میزان مرگ و میر در این بیماران بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد.

از جمله علل اصلی بروز سرطان‌ها می‌توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی‌ها اشاره کرد(۶). مشخص شده است که مصرف برخی فراورده‌های غذایی به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از بروز سرطان نقش مؤثری دارند(۷). ازجمله این فراورده‌ها می‌توان به سیلیمارین(Silymarin) اشاره کرد؛ یک فلاوونوئید پلی فنولیک که از دانه گیاه خارمریم (milk thistle) استخراج شده و حدود ۹۰٪ از آن را ترکیبی به نام سیلیبینین (Silibinin) به خود اختصاص می‌دهد(۸). سیلیبینین یک ترکیب آنتی اکسیدان است که از کبد در برابر آسیب‌های حاد و مزمن جلوگیری می‌کند. همچنین مشخص شده است که این ترکیب در کاهش میزان کلسترول خون و افزایش سیستم ایمنی تاثیر دارد(۹). مطالعات انجام شده طی سال‌های گذشته نشان داده است که سیلیبینین دارای خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های سرطانی ریه(۱۰-۱۱)، گلیوبلاستوما(۱۲)، پوست(۱۳)، مثانه(۱۴)، کبد(۱۵)، پروستات(۱۶-۱۷) و کلون(۱۸-۱۹) می‌باشد. امروزه از عصاره گیاه خارمریم به طورگسترده به عنوان یک مکمل غذایی بسیار اثربخش درامریکا و کشورهای اروپایی استفاده می‌شود.

با توجه به شیوع سرطان سینه در ایران، شیب صعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته، میزان مرگ و میر بالای مبتلایان و از طرفی دیگر با توجه به مصرف خوراکی، ارزان بودن و دسترسی آسان عموم به این فراورده گیاهی، در این تحقیق برآن شدیم تا اثربخشی سیلیبینین را برروی سلول‌های سرطان سینه بررسی کنیم. سلول‌های MCF-7 (رده سلولی انسانی سرطان سینه)، رده سلولی بسیار مناسب برای مطالعات in vitro در مورد سرطان سینه محسوب می‌شود و برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ از بافت سینه خانم ۶۹ ساله مبتلا به سرطان سینه جداسازی شدند؛ این مطالعه با استفاده از این سلول‌ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در محیط آزمایشگاه و با استفاده از رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) انجام شد. رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انیستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM از L -گلوتامین، ۱۰٪ FBS، پنی سیلین به میزان ۱۰۰ unit/mL و استریتوماسیون به میزان µg/mL ۱۰۰ در دمای ۳۷۰C و فشار ۵٪ از CO2 کشت داده شدند.

برای تیمار دارویی سلول‌ها، از داروی Silibinin که از شرکت سیگما خریداری شده است، استفاده شد. محلول ذخیره Silibinin به واسطه حل کردن این دارو در دی متیل سولفواکساید (DMSO) استریل ۰/۱٪ تهیه شد.

محلول ذخیره را در میکرو تیوب‌ها تقسیم کرده و آنها را در دمای ۲۰- درجه تا زمان مصرف نگهداری کردیم. به منظور تعیین اثرات بهینه دارو، ۲ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از داروی Silibinin تیمار شدند و به ترتیب پس از زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین سلول‌های MCF-7 که با دارو تیمار نشدند، به عنوان سلول‌های گروه کنترل استفاده شد. در ضمن به منظور افزایش بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایشات به صورت داپلیکیت انجام شد .

میزان حیات سلولی توسط تست MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) بررسی شد. جهت انجام تست بعد از دو بار ماساژ دادن، سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (۵۰۰۰ سلول در هر خانه) منتقل شدند. هنگامی که MTT زرد رنگ وارد سلول‌های زنده می‌شود، به وسیله آنزیم دهیدروژناز این سلول‌ها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند. به طور خلاصه، بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با گلوکز، محلول MTT (۵ mg/ml در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت حاوی سلول‌ها با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی در چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب‌های بنفش MTT، تکان داده شد. سپس توسط الایزاریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه اثر توکسیسیتی داروی Silibinin بر روی بقاء سلول‌های MCF-7 و بررسی میزان مرگ سلول‌های تیمار شده از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{میزان مرگ سلول‌ها}\ (\%) = 1 - \frac{OD\exp}{ODcont} \times 100$$

در این فرمول، OD exp و OD cont به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌باشد.

ابتدا سلول‌های MCF-7 توسط دوز ۲۰۰ میکرومولار silibinin به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس سلول‌های کنترل و تیمار شده را برداشته، سانتریفیوژ و با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. سپس بر روی پلت هر گروه سلولی (حاوی ۱۰۶ × ۵ سلول) محلول لیز کننده سلول (حاوی ۱٪ NP-40، ۰/۵ ٪ SDS، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH = ۷/۴)، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، ۵ میلی مولار EDTA، ۰/۵ ٪ سدیم داکسی کولات، ۱۰۰ میکرومولار PMSF و مهارکننده پروتئاز) افزوده و نمونه‌ها بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. هر ۵ دقیقه یک بار نمونه‌ها ورتکس شدند تا خوب هموژنیزه شوند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه (با شتاب ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتیگراد) سانتریفیوژ گردید تا پسماندهای حاصل از لیز رسوب گردند. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته شد و غلظت پروتئین توسط روش Bradford اندازه‌گیری شد. نمونه‌های پروتئین به حجم‌های کوچکتر مساوی تقسیم گردیده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

ابتدا نمونه‌های پروتئینی را با بافر نمونه 6X حاوی ۶۲ میلی مولار Tris-HCl (pH = ۶/۸)، ۲٪ SDS، ۲۵٪ گلیسرول، ۵٪ مرکاپتواتانول و ۰/۰۲٪ برموفنول بلو، مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند. میزان غلظت یکسانی از پروتئین‌های استخراج شده (۴۰ میکروگرم) از سلول‌های کنترل و تیمار شده، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ بر روی ورقه نیتروسلولز منتقل شد. تکنیک SDS-PAGE و بلاتینگ به ترتیب توسط دستگاه‌های Mini-Protean 4 Cell (الکتروفورز عمودی پروتئین) و Mini-Trans Blot (شرکت Bio-Rad) انجام گردید.

محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به طریق رنگ‌آمیزی Ponceau S بررسی و محل باند مورد نظر با استفاده از مارکر وزن مولکولی کنترل شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین Bax و Bcl-2 از آنتی بادی اولیه(Santa Cruz Biotechnology, USA) بر علیه این پروتئین‌ها استفاده شد. این آنتی بادی توسط آنتی بادی متصل به پراکسیداز (HRP) شناسایی و به طریق کمی لومینسانس (ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham) باند پروتئینی مورد نظر بر روی فیلم ظاهر گردید. از آنتی بادی اولیه بر علیه بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

سلول‌ها با دوز ۲۰۰ میکرومولار silibinin در محیط کشت برای ۱۸ ساعت انکوبه شدند و سپس سلول‌ها برداشت شده و RNA سلولی استخراج گردید. برای استخراج RNA از سلولهای مورد مطالعه، از محلول (Roche) TriPure Isolation Reagent طبق دستورالعمل استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های MCF-7 با داروی Silibinin و متعاقب گذشت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج شده و کمیت آنها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از (Fermentas) RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ میکرو لیتر بود و محتویات آن شامل ۴µl بافر 5X PCR، ۲µl از dNTP، ۱µl راندم هگزامر، ۱µl آب تیمار شده با DEPC، ۱µl مهار کننده RNase (۲۰ u/µl)، ۱µl ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (۲۰۰u/µl) و ۱µg از RNA مورد آزمایش به ازاء هر واکنش می‌باشد. محتوی مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه، ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه و ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند و در نهایت، واکنش سنتز cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه ای در دمای ۷۰ درجه پایان پذیرفت. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

آزمون Real-time PCR در دستگاه Rotor Gene 6000 Real Time PCR System (Qiagen) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازاء هر واکنش، ۱۰µl از Maxima SYBR green master mix (Fermentas)، ۲µl از محصول cDNA، ۰/۵ µl از هر یک از پرایمرها (۲۰nmol) و ۷ µl آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۵ سیکل برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه) و مرحله annealing/extension توأم (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

برای انجام مطالعات آماری از SPSS 16 استفاده شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از Paired Student's t-test بررسی شد. مقادیر به دست آمده با $P < ۵\%$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها:

بررسی میزان بقاء سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که silibinin رشد سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، دوز ۵۰ میکرو مولار دارو تأثیر چندانی بر بقاء سلول‌ها ندارد در حالی که دوز ۲۰۰ میکرومولار به طور مؤثری موجب مرگ سلول‌های MCF-7 با IC50 ۲۰۰ میکرومولار (در ۲۴ ساعت) می‌شود.

پروتئین Bax به عنوان یک پروتئین کلیدی در آپوپتوز القاء شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل

می‌کند. این پروتئین از طریق بر همکنش با پروتئین‌های غشاء میتوکندری موجب افزایش نفوذپزیری غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می‌شود. از طرفی دیگر Bcl-2 یک اثر آنتی آپوپتوتیک در پاسخ به محرک‌های مختلف آپوپتوز از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم c از میتوکندری اعمال می‌کند. برای بررسی میزان تأثیر silibinin بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2، میزان بیان mRNA این دو ژن توسط روش real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، silibinin میزان بیان mRNA ژن Bax را از نظر آماری به طور معنادار افزایش می‌دهد، در حالی که بر مقدار بیان ژن Bcl-2 تأثیری نداشت ($P < ۰/۰۵$ با علامت * در شکل ۲ نشان داده شده است).

افزایش بیان پروتئین Bax توسط silibinin در سلولهای MCF-7

برای تأیید نتیجه آزمون real-time PCR، با استفاده از آزمون وسترن بلات بیان پروتئین Bax و Bcl-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان پروتئین Bax نیز مطابق با نتیجه بیان mRNA از نظر آماری به طور معنادار افزایش داشت، در صورتی که در مقدار پروتئین Bcl-2 تغییری حاصل نشد (شکل ۳).

بحث :

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی زنان در کل دنیا بوده و شیوع ابتلا به این بدخیمی در اکثر کشورهای دنیا از جمله ایران رو به افزایش می‌باشد. از جمله علل مرتبط با شیب صعودی ابتلاء به سرطان می‌توان به عوامل محیطی از جمله آلودگی هوا، استرس، الگوی زندگی و رژیم غذایی افراد اشاره کرد. مشخص شده است که مصرف مواد غذایی که دارای خاصیت آنتی اکسیدان می‌باشند، در پیشگیری و کاهش ابتلاء به سرطان‌ها نقش مؤثری دارد(۲۰-۲۲). از طرفی دیگر، علیرغم استفاده از راهکارهای درمانی از جمله جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی همچنان میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به سرطان بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد. به علاوه، تأثیر مخرب شیمی‌درمانی و پرتودرمانی بر سلول‌های نرمال در حال تقسیم نیز از جمله معایب دیگر مرتبط با این پروسه‌های درمانی محسوب می‌شود(۲۳). لذا با توجه به موارد اشاره شده، گرایش و توجه به استفاده از فراورده‌های طبیعی و مکمل‌های غذایی دارای خاصیت ضد سرطانی طی سال‌های اخیر بسیار افزایش داشته است.

از جمله مکمل‌های غذایی مورد توجه در این خصوص، می‌توان به عصاره گیاه خارمریم اشاره کرد که اخیراً مطالعاتی راجع به اثر ضد سرطانی این فراورده گیاهی انجام شده است. اخیراً مؤمنی و همکارانش نشان داده‌اند که سیلیبینین که مهمترین محتوی عصاره گیاه خارمریم است، خصوصیات تهاجمی سلول‌های گلیوبلاستوما را از طریق مهار کاتپسین B کاهش می‌دهد(۱۲). در مطالعه انجام شده توسط Zhang، مشخص شد که سیلیبینین رشد سلول‌های سرطان معده SGC-7901 را از طریق کاهش بیان پروتئین p34cdc2 مهار می‌کند(۲۴). به علاوه، Kunatz نیز نشان داد که سیلیبینین آپوپتوز القاء شده از طریق TRAIL را در آدنوکارسینومای روده تقویت می‌کند(۲۵). همچنین سایر مطالعات از اثر ضد سرطانی سیلیبینین علیه سلول‌های سرطان ریه، مثانه، پروستات وکلون حکایت می‌کند(۱۰-۱۷). هم راستا با نتایج حاصل ازتحقیقات سایرین، نتایج حاصل ازتحقیق انجام شده نیز مؤید اثربخشی این فراورده گیاهی علیه سلول‌های سرطانی سینه می‌باشد؛ نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی MCF-7 با داروی سیلیبینین بطور وابسته به دوز و زمان سبب کاهش میزان تکثیر این سلول‌ها می‌گردد.

آپوپتوز فرآیندی بسیار تنظیم شده است که نقش بسیار مهمی در حفظ هموستاز در ارگانیسم‌های چند سلولی دارد(۲۶). مشخص شده است که آپوپتوز به واسطه بسیاری از

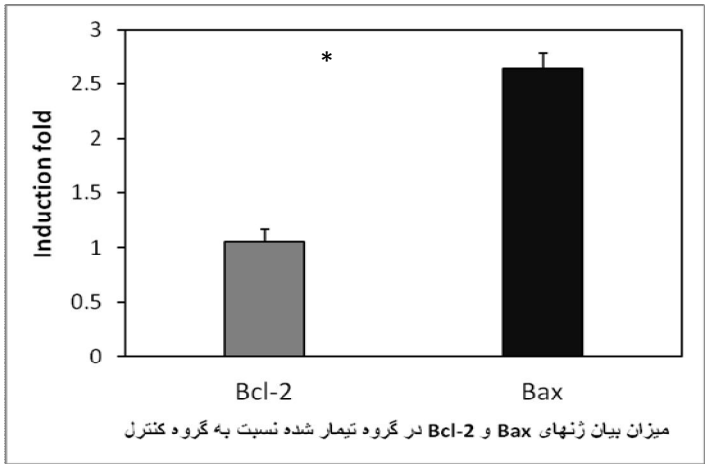
عوامل برون سلولی و درون سلولی کنترل می‌شود؛ از میان عوامل درون سلولی، تعادل بین Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوز) و Bax (معادل پروآپوپتوتیک Bcl-2) به عنوان مهمترین پارامتر تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به محرک خارج سلول معرفی شده است(۲۷). پروتئین Bax به عنوان یک پروتئین کلیدی در آپوپتوز القاء شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل می‌کند. این پروتئین از طریق بر همکنش با پروتئین‌های غشاء میتوکندری موجب افزایش نفوذپزیری غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می‌شود. از طرفی دیگر Bcl-2 یک اثر آنتی آپوپتوتیک در پاسخ به محرک‌های مختلف آپوپتوز از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم c از میتوکندری اعمال می‌کند. به همین دلیل و برای بررسی اثر سیلیبینین بر روی القاء مرگ سلولی در سلول‌های MCF7، بیان پروتئین و mRNA ژنهای Bax و Bc1-2 متعاقب تیمار سلولی اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان می‌دهد که silibinin به مقدار قابل توجهی میزان بیان mRNA ژن Bax را افزایش می‌دهد، در حالی که بر مقدار بیان ژن Bcl-2 تأثیری نداشت. همچنین همان طور که انتظار می‌رفت، میزان بیان پرتئین Bax مطابق با نتیجه بیان mRNA افزایش قابل توجهی داشت، در صورتی که در مقدار پروتئین Bcl-2 تغییری حاصل نشد.

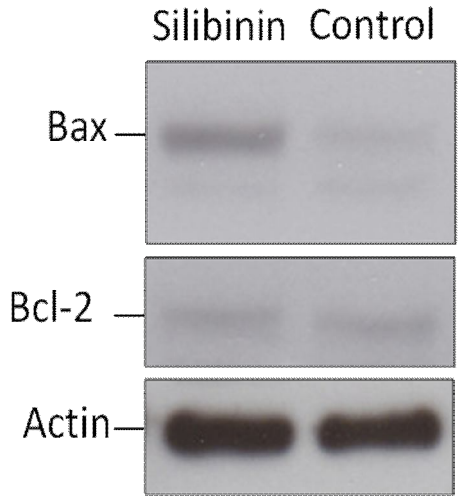
نتیجه‌گیری:

در مجموع، نتایج حاصل از پژوهش انجام شده موید خاصیت پروآپوپتوتیک سیلیبینین و اثربخشی این مکمل گیاهی علیه سلول سرطان سینه رده MCF-7 می‌باشد. طبیعی بودن، هزینه پائین و امکان دسترسی عموم به این فراورده، از جمله مزایای مورد توجه بوده و با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که مصرف این مکمل گیاهی در رژیم غذایی ممکن است در کاهش ابتلاء به سرطان سینه مؤثر باشد.

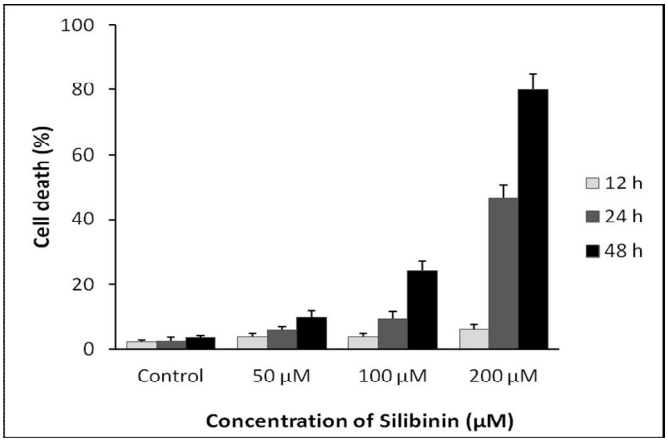
شکل ۱: القاء مهار رشد و مرگ سلولی توسط silibinin در سلولهای MCF-7. سلولهای MCF-7 با دوزهای مختلف دارو برای ۱۲، ۲۴ ، و ۴۸ ساعت در محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ تیمار شدند و میزان مرگ سلولی با روش MTT بررسی شد (n=3 ، mean ± SD)



شکل ۲: تاثیر silibinin بر میزان بیان ژنهای Bax و Bcl-2 . پس از تیمار سلولهای MCF-7 با silibinin ، RNA از سلولها استخراج گردید و میزان بیان نسبی mRNA هر کدام از ژنها پس از نرمال سازی با ژن GAPDH محاسبه شد (n=3 ، mean ± SD)



شکل ۳: افزایش بیان پروتئین Bax تحت تاثیر silibinin در سلولهای MCF-7 . پس از تیمار سلولهای MCF-7 با silibinin ۲۰۰ میکرومولار، پروتئین سلولی استخراج گردید و بیان پروتئین Bax و Bcl-2 ارزیابی شد. از پروتئین اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.



جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون real-time PCR

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Size (bp)
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC	226
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	242
Bcl-2	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	90

References:

1- Fisch, T., et al., Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. Ann Oncol, 2005. 16(12): p. 1882-8.
2- Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res, 2004. 6(6): p. 229-39.
3- Farooq, S. and M.P. Coleman, Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales. J Epidemiol Community Health, 2005. 59(5): p. 402-6.
4- Shibuya, K., et al., Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. BMC Cancer, 2002. 2: p. 37.
5- Harirchi, I., et al., Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Ann Oncol, 2011. 22(1): p. 93-7.
6- Moller, P., H. Wallin, and L.E. Knudsen, Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. Chem Biol Interact, 1996. 102(1): p. 17-36.
7- Namiki, M., Antioxidants/antimutagens in food. Crit Rev Food Sci Nutr, 1990, (4)29. p. 273-300.
8- Deep, G. and R. Agarwal, Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. Cancer Metastasis Rev, 2010. 29(3): p. 447-63.
9- Singh, R.P. and R. Agarwal, A cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenic and survival signaling in prostate cancer. Mutat Res, 2004. 555(1-2): p. 21-32.
10- Chu, S.C., et al., Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. Mol Carcinog, 2004. 40(3): p. 143-9.
11- Mateen, S., et al., Silibinin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators. Mol Carcinog, 2010. 49(3): p. 247-58.
12- Momeny, M., et al., Silibinin inhibits invasive properties of human glioblastoma U87MG cells through suppression of cathepsin B and nuclear factor kappa B-mediated induction of matrix metalloproteinase 9. Anticancer Drugs, 2010. 21(3): p. 252-60.
13- Mohan, S., et al., Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 320(1): p. 183-9.
14- Tyagi, A., et al., Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. Carcinogenesis, 2004. 25(9): p. 20-1711.
15- Momeny, M., et al., Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. Eur J Pharmacol, 2008. 59: (3-1)1. p. 13-20.
16- Singh, R.P. and R. Agarwal, Prostate cancer prevention by silibinin. Curr Cancer Drug Targets, 2004. 4(1): p. 1-11.
17- Gazak, R., D. Walterova, and V. Kren, Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. Curr Med Chem, 2007. 14(3): p. 315-38.
18- Yang, S.H., et al., Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. J Surg Res, 2003. 113(1): p. 133-8.
19- Agarwal, C., 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. 22(51): p. 8271-82.
20- Ren, W., et al., Flavonoids: promising anticancer agents. Med Res Rev, 2003. 23(4): p. 519-34.
21- Sylvester, P.W.D. and S. Shah, Antioxidants in Dietary Oils: Their Potential Role in Breast Cancer Prevention. Malays J Nutr, 2002. 8(1): p. 1-11.

22- Baumeister, P., M. Reiter, and U. Harreus, Curcumin and other polyphenolic compounds in head and neck cancer chemoprevention. Oxid Med Cell Longev, 2012. 2012: p. 902716.
23- Chabner, B.A. and M.A. Friedman, Progress against rare and not-so-rare cancers. N Engl J Med, 1992. 326(8): p. 563-5.
24- Zhang, Y., et al., Silibinin Triggers Apoptosis and Cell-Cycle Arrest of SGC7901 Cells. Phytother Res, 2012.
25- Kauntz, H., et al., The flavonolignan silibinin potentiates TRAIL-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma and in derived TRAIL-resistant metastatic cells. Apoptosis, 2012.
26- Raff, M.C., Social controls on cell survival and cell death. Nature, 1992. 356(6368): p. 397-400.
27- Cory, S. and J.M. Adams, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer, 2002. 2(9): p. 647-56.

Original Article

Apoptotic Effect of milk thistle extract on human breast cancer MCF-7 cell

Bashash D*[1], Safa M[2], Shahbazi A[3], Mohammadian M[4], Shah-Mohammad N[5]

1. Department of Hematology, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Cellular and Molecular research Center, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences,Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. slamic azad university, Science and Research Campus, Kurdistan branch, Sanandaj ,Iran.
4. Department of Hematology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences.
5. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences.

Received: 19 February, 2012; Accepted: 18 December, 2012

Abstract:

Introduction: Given the prevalence of breast cancer in Iran, the increased incidence of this malignancy during the past two decades, the high mortality rate of patients, and according to oral consumption, low cost and easy access to the public extracts of milk thistle, in this study we aimed to investigate the effectiveness of this herb on MCF-7 breast cancer cells.

Methods: In order to investigate the effect of silibinin in breast cancer, MCF-7 cells were cultured in the presence of different concentrations of the drug. MTT assay, Immunoblotting, and quantitative real-time PCR were used to assess the effect of the drug on cell viability and the expression levels of mRNA and protein of Bax and Bcl-2 genes.

Results: Evaluation of cell survival using the MTT assay showed that silibinin reduced the viability of MCF-7 cells in a time and dose dependent manner. The results of this study showed that silibinin significantly increased levels of Bax mRNA expression, while the amount of Bcl-2 gene expression was not affected. As expected according to the results of real-time PCR, expression level of Bax protein was also increased significantly, whereas the Bcl-2 protein level was not changed.

Conclusion: Overall, the results of this study confirm the efficacy of this herb against breast cancer. Therfore, the milk thistle as a natural herb supplement with low cost and public access, could be effective in breast cancer therapy.

Key words: silibinin, breast cancer, MCF-7 cells, Bax, Bcl-2.

*Corresponding author: Email: David_5980@yahoo.com