

## بررسی اثر مهارى سيليبينين بر رشد و خواص بنيادينگى مامواسفيرهاى حاصل از سلولهاى رده MCF-7

جواد فيروزي<sup>۱</sup>، مرضيه ابراهيمي<sup>۲\*</sup>، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی<sup>۳</sup>

### چکیده

مقدمه: مجموعه کوچکی از سلولها با عنوان سلولهای بنیادی سرطان با قابلیت خودنوزایی و تمایز به سایر سلولهای توموری در بافت توموری وجود دارند که هدفگیری آنها از عود مجدد سرطان جلوگیری می‌کند. سيليبينين که از گیاه خار مریم از تیره کاسنی با نام علمی Silybum Marianum به دست می‌آید واجد خواص ضد سرطانی است. با این وجود مطالعات کمی در خصوص اثر این ماده بر بنيادينگى سلولهاى بنیادی سرطان وجود دارد، لذا هدف این مطالعه بررسی اثر سيليبينين بر توانایی خودنوزایی، رشد، بیان شاخصها و ژنهای بنيادينگى مامواسفيرهاى حاصل از سلولهاى رده MCF-7 است.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی مداخله‌ای، مامواسفيرهاى حاصل از رده سلولى MCF-7، با غلظت‌های مختلف سيليبينين به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس درصد زنده‌مانی سلولها توسط آزمون MTS بررسی و دز ۵۰٪ کشندگی (IC50) آن برای اجرای بقیه آزمونها مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه توانایی تشکیل کلونی و اسفير، تهاجم و بیان ژنهای بنيادينگى (Oct4, KLF4) در مامواسفيرهاى تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: سيليبينين به صورت وابسته به دز سبب کاهش سلولهاى MCF-7 در مامواسفيرها شد. سيليبينين در دز ۱۵۰ میکرومولار (IC50) سبب کاهش ۴/۶ برابری توانایی تشکیل اسفير، کاهش ۱۱/۲ برابری توانایی تشکیل کلونی و کاهش معنی‌دار ( $p < 0.008$ ) تهاجم و بیان ژنهای بنيادينگى شد.

نتیجه‌گیری: سيليبينين با کاهش رشد، کلونی زایی، اسفيرزایی، تهاجم و همچنین کاهش بیان ژنهای بنيادينگى می‌تواند کاندید مناسبی برای هدفگیری سلولهاى بنیادی سرطان باشد.

واژه‌های کلیدی: سلولهای بنیادی سرطان، سيليبينين، مامواسفير، توانایی زیستی

۱- کارشناس، زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران و گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، جهاددانشگاهی، تهران

۲- دانشیار ایمنولوژی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، جهاددانشگاهی، تهران

۳- استادیار ایمنولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۱۲۳۵۶۲۵۱۶، پست الکترونیکی: mebrahimi@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۸

## مقدمه

سرطان پستان به عنوان يك سرطان هتروژن كه از زيرمجموعه‌هاى سلولى با ويژگى‌هاى متفاوتى تشكيل شده است (۱)، عامل بيشترين مرگ‌ومير ناشى از سرطان در بين زنان در ايران و كشورهاي توسعه يافته است (۲). مطالعات دهه‌هاى اخير نشان داده‌اند كه جمعيت كوچكى از سلول‌هاى بافت تومورى، با قابليت خودنوزايى، مسئول رشد و گسترش تومور مى‌باشند. اين سلول‌ها مقاوم به دارو بوده و مسئول عود مجدد سرطان و متاستاز به دنبال درمان‌هاى رايج و متداول مى‌باشند (۳-۵) به اين ترتيب يافتن راه‌هايى كه علاوه بر هدف‌گيرى سلول‌هاى تومورى، سلول‌هاى بنيادى تومور را نيز هدف مى‌گيرند، ضرورى است.

تومورهاي جامد در بدن موجودات زنده به صورت ساختارهاي فضايى سه‌بعدى رشد مى‌کنند و سلول‌هاى سرطاني موجود در اين بافت‌هاى تومورى به صورت ناهمسان در معرض استرس‌ها، فشارهاي فيزيكي، داروها، اكسيژن و مواد غذايي قرار مى‌گيرند و طبيعتاً نفوذ داروها، اكسيژن و مواد غذايي به سلول‌هاى مختلف بافت تومورى يكسان نخواهد بود. سلول‌هايى كه در نواحى داخلى تر بافت تومورى قرار دارند، به ميزان كمترى در معرض مواد گفته شده قرار مى‌گيرند (۶). بنابراين كشت سلول‌ها به صورت تك لايه ساختار سلول‌ها در بافت تومورى را بازسازى نمى‌كند (۷)، اما در كشت سه‌بعدى، تعامل بين سلول‌ها به گونه‌اى است كه ساختار سلولى، چسبندگى بين سلول‌ها و همچنين مسيرهاي پيام‌رسانى تحت تاثير قرار مى‌گيرد (۸). در واقع كشت سلول‌ها به صورت ساختارهاي سه بعدى مى‌تواند اطلاعاتى از سلول‌هاى موجود در بافت تومورى را در اختيار محققين قرار دهد كه با استفاده از كشت‌هاي تك لايه دسترسى به آن اطلاعات امكان پذير نيست (۹).

با توجه به اينكه استفاده از مدل‌هاى حيوانى در تحقيقات سرطان، علاوه بر گران بودن، وقت‌گير بوده و با مشكلات فراوانى همراه است (۱۰). بنابراين استفاده از مدل‌هاى ۳ بعدى كشت سلول مى‌تواند در حل برخى از مشكلات همچون نقص در رسيدن دارو به سلول‌هاى بنيادى سرطان، غربالگري و

ايمنى مفيد واقع شود. مامواسفيرهاي تومورى حاصل كشت سلول‌هاى سرطاني در سطح غير چسبنده و بدون سرم هستند و مدلى براى كشت ۳ بعدى سلول‌هاى سرطاني محسوب مى‌شوند. لذا در اين مطالعه از مدل مامواسفير براى غنى‌سازى سلول‌هاى بنيادى سرطان و نيز الگويى براى كشت سه بعدى سلول‌هاى تومورى استفاده شد.

امروزه عوامل داروئى حاصل از گياهان و يا مكمل‌هاى درمانى مشتق از آن‌ها، مى‌توانند براى هدف‌گيرى سلول‌هاى بنيادى سرطان مورد آزمون قرار گيرند، يكي از مزايای مهم اين عوامل اين است كه برخلاف داروهاي شيميايي، سميت كمترى براى سلول‌ها دارند (۱۱-۱۳). سيليمارين و ماده اصلى تشكيل‌دهنده آن، سيليبينين كه از عصاره گياه خار مريم از تيره كاسنى با نام علمى *Silybum Marianum* به دست مى‌آيند، از قديم در درمان بيماري‌هاى زيادى به‌خصوص در درمان بيماري‌هاى كبدي مورد استفاده قرار گرفته است و اثرات درمانى مؤثري دارد، همچنين اين دارو اثرات جانبي بسيار كمى دارد به طوري كه غلظت ۲ ميلي‌گرم بر كيلوگرم از آن نيز فاقد اثرات جانبي در انسان و جوندگان بوده است (۱۴-۱۶). اين تركيب مى‌تواند توسط مكانيسم‌هاى متفاوت از جمله تنظيم چرخه سلولى، مهار رگزاى، مهار تهاجم و متاستاز، بسيارى از وقايع مولكولى را بدون بر جاى گذاشتن اثرات سمى تحت تاثير قرار دهد (۱۷، ۱۸)، لذا در درمان سرطان‌هاى مختلف از جمله سرطان پروستات، كولون و ساير سرطان‌ها به عنوان داروى ضد سرطان پيشنهاده شده است.

گزارش‌هايى در خصوص اثرات ضد سرطاني سيليبينين وجود دارد، اما هيچ گزارشى مبنى بر بررسى اثرات سيليبينين بر سلول‌هاى بنيادى سرطان پستان در قالب مامواسفيرها وجود ندارد. لذا در اين مطالعه اثر سيليبينين را بر رشد، بنيادينيگى و قدرت تهاجم و مهاجرت مامواسفيرهاي حاصل از رده تومرى MCF-7 مورد بررسى قرار گرفت.

## روش بررسى

اين مطالعه از نوع مطالعات آزمايشگاهى مداخله‌اى است.

و ۷۲ ساعت در شرایط CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷° سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مقادیر مساوی، محلول (MTS (promega G5430 مطابق دستورالعمل شرکت سازنده به محیط کشت هر چاهک اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO<sub>2</sub>) انکوبه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول داخل هر چاهک را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف جدید انتقال داده و بعد از قرار دادن پلیت در دستگاه Eliza Reader (Bio-tek Instruments, USA) جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر سنجیده شد، نهایتاً درصد زنده مانده مامواسفیرها با استفاده از فرمول زیر محاسبه و غلظتی از سیلیبیین که سبب ۵۰ درصد کشتندگی مامواسفیرها شد، به عنوان IC<sub>50</sub> (Half Maximal Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد. گروه‌های مختلف تیمار شده و تیمار نشده در تکرارهای سه‌تایی انجام شدند، به‌منظور حذف اثر حلال دارو، برای مقادیر مساوی از حلال دارو نیز آزمون MTS انجام و در نتایج کلی اثر داده شد.

$$\text{میانگین جذب نمونه‌های تیمار شده با هر غلظت از سیلیبیین} \times 100 = \frac{\text{میانگین جذب نمونه تیمار نشده فاقد سیلیبیین}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار شده با هر غلظت از سیلیبیین}} \times 100 = \text{درصد زنده مانده مامواسفیرها}$$

آزمایش توانایی تشکیل کلونی: ۲۰۰ سلول از مامواسفیرهای گروه تیمار نشده و مامواسفیرهای تیمار شده با غلظت IC<sub>50</sub> از سیلیبیین در هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ FBS کشت و به مدت ۱۰ روز در شرایط CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷° سانتی‌گراد انکوبه شدند، سپس محیط کشت هر چاهک تخلیه و توسط محلول PBS شستشو انجام شد، به‌منظور تثبیت کلونی‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پارا فرم آلدهید ۴٪ به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C انکوبه شد، نهایتاً محلول پارا فرم آلدهید تخلیه و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰۵٪/۰۵ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی انجام شد. کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس شمارش شدند.

آزمایش توانایی تشکیل اسفیر: سلول‌های به دست آمده از مامواسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبیین، با تراکم

کشت سلول‌های رده توموری MCF-7: رده سلولی MCF-7 سرطان پستان از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی (تهران، ایران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط (DMEM) Dulbecco's modified Eagle's medium حاوی ۲ میلی‌مول بر لیتر L-Glutamine، آنتی‌بیوتیک (100U/ml پنی‌سیلین و 100µg/ml استرپتومایسین)، اسید آمینه‌های غیرضروری (NEAA) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و در انکوباتور با شرایط CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷° سانتی‌گراد نگهداری شدند، جهت جدا کردن سلول‌ها از سطح ظرف کشت، از محلول (L-Tripsine/EDTA) استفاده شد، DMEM، L-Glutamine، Penisilin/Streptopycin، Tripsine/EDTA و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت (Gibco Invitrogen, Grand Island, New York, USA) خریداری شدند.

کشت مامواسفیر: کشت مامواسفیر با استفاده از یک روش معلق سازی سلول‌ها در محیط مایع انجام شد. سطح پلیت‌های ۲۴ خانه ته صاف و فلاسک‌های T25 به‌وسیله محلول پلی‌هما (Poly-HEMA; Sigma, (2-hydroxyethyl methacrylate) (St Louis, Missouri, USA) با غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ پوشیده شد. ۱۵×۱۰<sup>۳</sup> سلول در میلی‌لیتر، بر سطح غیر چسبنده و در محیط کشت بدون سرم دارای چند فاکتور رشد از جمله ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیروبللاستی پایه (Royan (basic fibroblast growth factor) (Royan (epidermal growth factor) (bFGF)Institute, Tehran, Iran)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)Institute, Tehran, Iran) و ۲٪ B27 (Gibco) (محیط کشت مامواسفیر)، کشت شد.

سنجش زنده‌مانی سلول‌ها در کشت مامواسفیر با استفاده از آزمون MTS: ۱۵×۱۰<sup>۲</sup> سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف پوشیده شده با پلی‌هما، در ۱۰۰ میکرولیتر محیط مامواسفیر کشت شد. ۹۶ ساعت بعد، طبق دستورالعمل، سیلیبیین (sigma, S0۴۱۷) در اتانول مطلق حل شد و مقدار مساوی از همان محیط کشت به تنهایی یا به علاوه غلظت‌های مختلف سیلیبیین (۰ تا ۱۶۰۰ میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه

بررسی بیان ژن‌های بنيادي نگی با استفاده از تکنیک Real time PCR: با استفاده از ترايزول (Invitrogen)، mRNA تام از مامواسفيرهای تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين استخراج شد. با استفاده از کیت سنتز cDNA، RevertAid H، Minus First Strand (TAKARA, PR037A)، SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (TAKARA, PR820L) و دستگاه Rotor-Gene6000(Corbett)، cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سنتز و رونویسی معکوس (qRT-PCR) انجام شد. رونوشت ژن GAPDH به عنوان نرمال کننده جهت تعیین رونوشت نسبی بقیه ژن‌ها اندازه‌گیری شد ( $\Delta\Delta Ct$ ).

مطالعات آماری: مطالعات آماری این مقاله با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 6 و با آزمون‌های t test و 2 way ANOVA انجام گرفت. درجه معنی‌داری  $p < 0.001$  در نظر گرفته شده است. کد اخلاق اخذ شده از کمیته اخلاق ۹۴۰۰۳۱ می‌باشد.

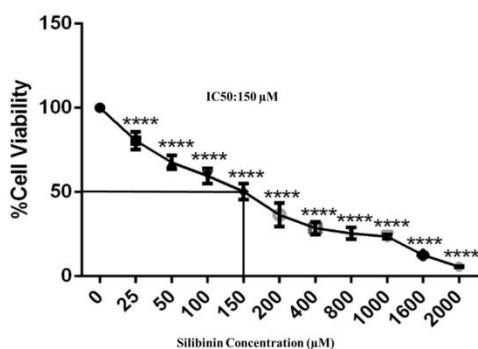
### نتایج

بررسی اثر سيليبينين بر درصد زنده‌مانی مامواسفيرهای مشتق از رده توموری MCF-7: مامواسفيرها با استفاده از غلظت‌های مختلف سيليبينين ( $0-2000 \mu M$ ) تیمار شده و میزان زنده‌مانی آن‌ها توسط تست آزمون MTS پس از ۷۲ ساعت مطابق با آنچه در بالا توضیح داده شده، محاسبه گردید. دز ۵۰ درصد کشندگی ( $IC_{50}$ ) به عنوان دز منتخب برای ادامه مطالعه استفاده شد.

نتایج نشان داد که سيليبينين در یک روش وابسته به دز، سبب کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود (نمودار ۱). دز ۱۵۰ میکرومولار سيليبينين به عنوان دزی انتخاب شد که موجب ۵۰ درصد کاهش زنده‌مانی می‌شود.

۱۵۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای پوشیده شده با پلی‌هما و در محیط مامواسفير کشت و بعد از ۷ روز مامواسفيرهای با قطر بزرگ‌تر از ۵۰ میکرومتر و تا ۴۰۰ میکرومتر در هر چاهک شمارش شد.

آزمایش توانایی تهاجم: تهاجم سلولی با استفاده از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای و فیلترهای transwell دارای غشاء پلی‌کربنات حاوی منافذ  $8/0$  میکرومتر (Millipore) انجام شد. به منظور بررسی توانایی تهاجم، فیلترهایی که یک شب قبل از انجام آزمایش با ۶۰ میکرولیتر ماتریژل (Sigma) رقیق شده (غلظت  $0.5$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پوشش داده شده‌اند مورد استفاده قرار گرفتند، سوسپانسیون سلولی با غلظت  $10^3 \times 125$  سلول در میلی‌لیتر از مامواسفيرهای تیمار نشده و تیمار شده با غلظت  $IC_{50}$  از سيليبينين، در محیط کشت DMEM بدون سرم تهیه شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده را به فیلترها اضافه و در قسمت پایین (داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه) هم ۶۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ FBS اضافه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای  $37^\circ$  و ۵٪  $CO_2$  انکوبه شدند. سلول‌های باقی‌مانده در قسمت داخلی فیلترها را با استفاده از سوآپ پنبه‌ای برداشته و سلول‌های چسبیده به قسمت پایینی فیلترها، با پارافرم آلدئید ۴٪ به مدت ۱ ساعت و در دمای  $4^\circ$  تثبیت و سپس با استفاده از کریستال ویوله  $0.5$ ٪ به مدت ۲ دقیقه رنگ شدند، با قرار دادن فیلترها در چاهک‌های حاوی ۶۰۰ میکرولیتر آب، شستشو انجام شد. با استفاده از استریو میکروسکوپ با بزرگنمایی  $20 \times$  سلول‌های چسبیده به سطح پایینی فیلترها در ۱۰ ناحیه تصادفی شمارش و نهایتاً میانگین سلول‌های شمارش شده مربوط به آزمایش تهاجم، در گروه‌های تیمار نشده و تیمار شده ثبت شد. گروه‌های مختلف در تکرارهای سه تایی انجام شدند.

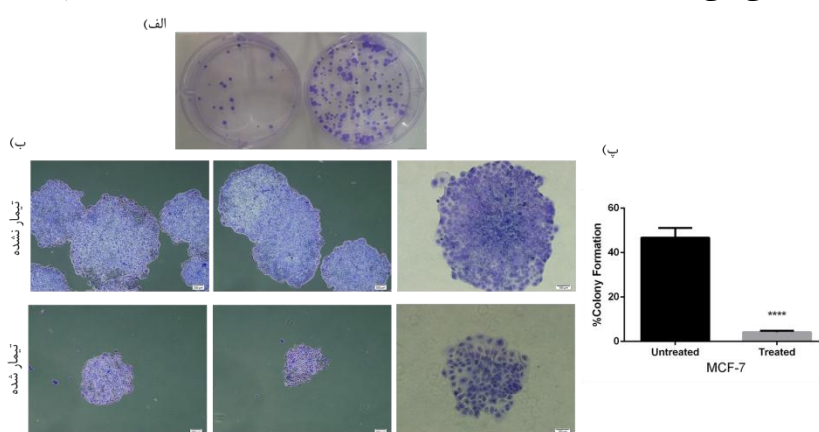


نمودار ۱: درصد زنده ماموسفیرها پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیبینین

ماموسفیرهای مشتق از رده MCF-7 توسط سیلیبینین در غلظت‌های ۰-۲۰۰۰ µM تیمار شدند و ۷۲ ساعت پس از تیمار، میزان سلول‌های زنده با استفاده از آزمون MTS بررسی شد. غلظت ۱۵۰ میکرومولار سیلیبینین سبب کاهش ۵۰ درصدی زنده مانی ماموسفیرها شد، (نتایج حاصل سه تکرار بیولوژیک است، علامت \*\*\*\* نشان‌دهنده  $p < 0.0001$  است).

مشتق از رده MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اجرای تست از دُز  $IC_{50} = 150 \mu M$  استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱ (الف) نشان داده شده است، توان کلونی‌زایی به دنبال تیمار با سیلیبینین کاهش می‌یابد. از نظر مورفولوژی، اندازه کلونی‌های حاصل از ماموسفیرها در گروه تیمار نشده، بزرگ‌تر بوده و از تعداد زیادتری سلول با تراکم، انباشتگی و فشردگی بیشتری برخوردار بودند، تیمار با سیلیبینین سبب شد که کلونی‌هایی کوچک با فشردگی و تعداد سلول کمتر حاصل شود (شکل ۱ ب). شمارش تعداد کلونی‌ها در هر دو گروه نشان‌دهنده کاهش ۱۱/۲ برابری قدرت تشکیل کلونی به دنبال تیمار با سیلیبینین است (شکل ۱ پ،  $p < 0.0001$ ).

بررسی توانایی تشکیل کلونی توسط سلول‌های ماموسفیر تیمار شده و تیمار نشده با سیلیبینین: سلول‌های بنیادی سرطان قدرت خودنوزایی و تمایز به سایر سلول‌های سرطانی را دارند، لذا برای بررسی این خاصیت در آزمایشگاه می‌توان از روش سنجش توانایی تشکیل کلونی استفاده کرد. در این روش سلول‌های بنیادی سرطان، سلول‌های پیش‌ساز و سلول‌های تمایز یافته نهایی، تکثیر شده و کلونی‌هایی با مشخصات منحصر به فرد ایجاد می‌نمایند. به این ترتیب با اجرای این تست به راحتی می‌توان اثر یک دارو را بر سلول‌های بنیادی و یا تمایز یافته را به دست آورد. بر اساس آنچه که در بالا گفته شد، اثر سیلیبینین بر پتانسیل کلونی‌زایی سلول‌های ماموسفیر

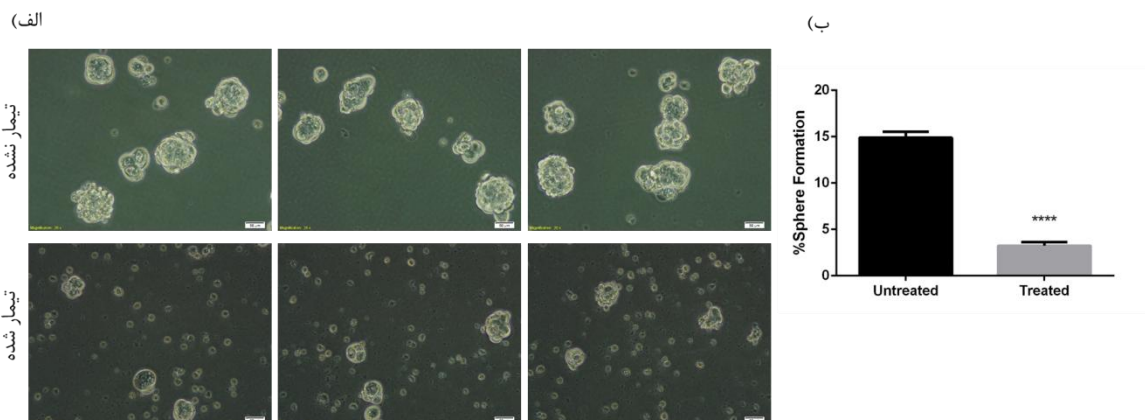


شکل ۱: سنجش قدرت کلونی‌زایی در سلول‌های ماموسفیر تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین

(الف) نمای ماکروسکوپی از تراکم کلونی‌های ایجادشده توسط گروه تیمار نشده (سمت راست) و گروه تیمار شده (سمت چپ) پس از ۱۲ روز کشت. (ب) مورفولوژی کلونی‌های تشکیل شده توسط سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با دُز  $150 \mu M$  سیلیبینین بعد از ۱۲ روز. (پ) مقایسه درصد کلونی‌زایی سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار سیلیبینین را نشان می‌دهد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند. علامت \*\*\*\* نشان‌دهنده  $p < 0.0001$  می‌باشد.

سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار شده توانایی خود را در تشکیل اسفیر از دست داده‌اند (شکل ۲ الف) و نسبت به گروه تیمار نشده کاهش ۴/۶ برابری در توانایی اسفیرزایی مشاهده شد. (شکل ۲ ب،  $p < 0.0001$ ).

آزمایش توانایی تشکیل اسفیر (اسفیرزایی): یکی دیگر از تست‌هایی که توان خونوزایی سلول‌ها را در آزمایشگاه نشان می‌دهد، توانایی تشکیل اسفیر در محیط فاقد سرم و در ظرف کشت فاقد چسبندگی است. نتایج تست اسفیرزایی به دنبال تیمار ماموسفیرها با دُز ۱۵۰  $\mu\text{M}$  سيليبينين نشان داد که

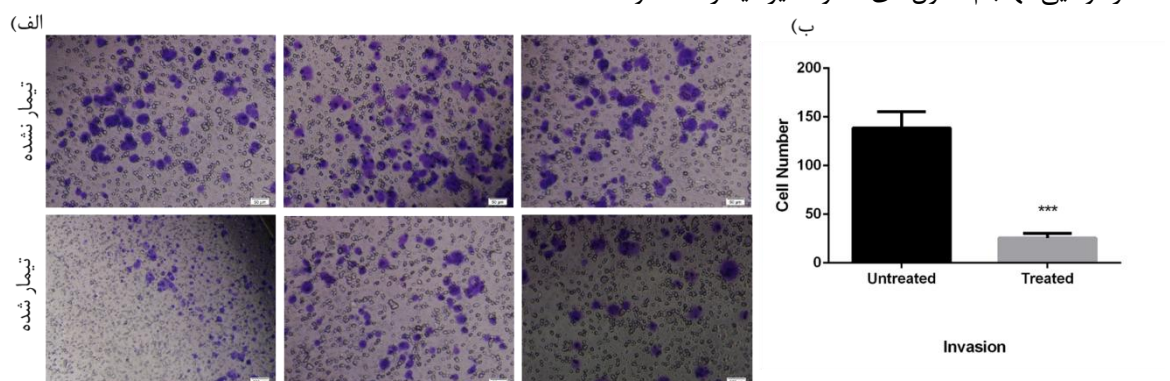


شکل ۲: سنجش قدرت اسفیرزایی در سلول‌های ماموسفیر تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين

(الف) اسفیرهای تشکیل شده توسط سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين را بعد از ۷ روز نشان می‌دهد، (ب) مقایسه درصد اسفیرزایی سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين را نشان می‌دهد، دُز ۱۵۰ میکرومولار سيليبينين سبب کاهش تعداد اسفیرها به میزان ۴/۶ برابر نسبت به گروه تیمار نشده شد، نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند علامت \*\*\*\* نشان‌دهنده  $p < 0.0001$  است.

تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار ( $IC_{50}$ ) از سيليبينين مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ (الف) و (ب) نشان داده شده است، تعداد سلول‌های دارای پتانسیل تهاجم در گروه تیمار شده، نسبت به گروه تیمار نشده ۶/۳ کاهش یافته است ( $p < 0.0008$ ).

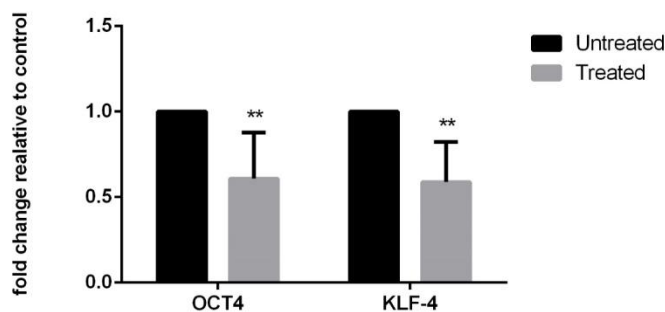
بررسی توانایی تهاجم سلول‌های ماموسفیر تیمار نشده و تیمار شده با سيليبينين: سلول‌های بنیادی سرطان از جمله اصلی‌ترین سلول‌هایی هستند که در تهاجم سرطان نقش دارند، لذا پتانسیل تهاجم را به عنوان یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان معرفی کرده‌اند. بر این اساس در مطالعه حاضر توانایی تهاجم سلول‌های ماموسفیر تیمار نشده و



شکل ۳ (الف) سلول‌های تهاجم کرده حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده را بعد از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله نشان می‌دهد، (ب) مقایسه تعداد سلول‌های دارای پتانسیل تهاجم را در ماموسفیرها تیمار نشده و تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار از سيليبينين را نشان می‌دهد. سيليبينين باعث کاهش ۶/۳ برابری تعداد سلول‌های دارای پتانسیل تهاجم، در گروه تیمار شده نسبت به گروه تیمار نشده شد ( $p < 0.0008$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند.

بررسی شد، ماموسفیرهای تیمار نشده به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، سیلیبینین باعث کاهش معنی‌داری ( $p < 0.0001$ ) در بیان ژن‌های OCT4 (۲/۳ برابر) و KLF4 (۴/۸ برابر) شد.

بررسی اثر سیلیبینین بر ژن‌های تنظیم کننده بنیادینگی در ماموسفیرهای مشتق از رده MCF-7: میزان بیان ژن‌های مربوط به بنیادینگی شامل OCT4 و KLF در ماموسفیرها، به دنبال تیمار با سیلیبینین (۱۵۰  $\mu$ M) توسط qRT-PCR



نمودار ۲: بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی در ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین توسط qRT-PCR. سیلیبینین باعث کاهش معنی‌داری ( $p < 0.0001$ ) در بیان ژن‌های OCT4 و KLF4 (به ترتیب ۲/۳ و ۴/۸ برابر) نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار حاصل از آنالیز 2way ANOVA سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند. علامت \*\* نشانه  $p < 0.0001$  است.

### بحث

اثر بر رشد ماموسفیرها مورد هدف این مطالعه نبوده است، با این وجود Wang و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که سیلیبینین با اثر بر مسیر سیگنالینگ IL4/6 می‌تواند باعث کاهش رشد کولونواسفیرها می‌شود (۲۳). همچنین گزارشی نیز در خصوص اثر مهار سیلیبینین را بر رشد، تکثیر و توانایی تهاجم رده‌های سلولی OVCAR8 و SKOV3 سرطان تخمدان به واسطه اثرگذاری بر مسیر HRG/HER3 وجود دارد (۲۴). از سوی دیگر شرایط فیزیولوژیکی ساختارهای کروی به وضوح به اندازه اسفیر، ویژگی‌های سلول‌های مورد استفاده، تراکم سلولی در ساختار اسفیر و همچنین به طور مستقیم یا غیرمستقیم به زمان کشت اسفیر وابسته است و بعد از ۹۶ ساعت، قطر ماموسفیرهای مورد بررسی (حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر) در این مطالعه که با استفاده از معادله  $d = (a \times b)^{1/2}$  (a و b قطرهای قائم ماموسفیرها هستند) محاسبه شده، به خوبی میانگین‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس را بازسازی می‌کند (۲۵)، لذا به نظر می‌رسد با استفاده از IC50 به دست آمده بتوان به تخمین درستی جهت رسیدن به دُز مناسب مورد استفاده در شرایط *in vivo* رسید.

در این مطالعه اثر مستقیم سیلیبینین بر ماموسفیرهای حاصل از رده توموری MCF-7 (آدنوکارسینوما پستان انسان) مورد بررسی قرار گرفت. ماموسفیرها به عنوان مدلی از کشت سه بعدی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند و به منظور غنی‌سازی سلول‌های بنیادی سرطان در این مدل، از محیط کشت بدون سرم در ظرف غیر چسبنده و افزایش bFGF و EGF استفاده شد. وجود سلول‌های بنیادی سرطان در ماموسفیرهای این رده توموری توسط مطالعات متعدد به اثبات رسیده است انتخاب ماموسفیرها در این مطالعه به دو علت صورت گرفت: ۱: به عنوان مدلی که غنی از سلول‌های بنیادی سرطان است و ۲: مدل مناسبی است که شبیه‌سازی کننده جنبه‌های هندسی، مکانیکی و بیوشیمیایی بافت واقعی است و این آغاز کننده برهمکنش‌های سلول با سلول و سلول با سوپسترا است که تنظیم کننده تکثیر و تمایز است.

نتیجه این مطالعه نشان داد که ماموسفیرهای حاصل از رده MCF-7 در روشی وابسته به دُز تحت تأثیر سیلیبینین قرار گرفته و درصد زنده‌مانی سلول‌های تشکیل دهنده آن‌ها به دنبال تیمار دارویی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. اگرچه مکانیسم

کاهش ژن‌های مربوط به بنيادينگى در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان سر و گردن (۳۵)، سرطان کولون (۲۳) و سرطان کولورکتال (۳۶) شود. البته در سرطان‌های مختلف نقش تنظيمى KLF4، وابسته به نوع بافت سرطانى مى‌تواند مهارکننده و يا پيش برنده سرطان باشد.

نتايج مطالعه ما حاكى از اثرات مهارى سيليبينين بر سلول‌های بنيادى در قالب ماموسفيرهای حاصل از حاصل از سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان است، به علاوه نتايج حاصل از اثر سيليبينين بر ماموسفيرها قویاً پيشنهاده مى‌کند اثرات آن را به‌ویژه در شرايط *in vivo* به منظور استفاده از آن به عنوان يک عامل مهارکننده سلول‌های بنيادى سرطان پستان مورد بررسى‌های بيشتري قرار گيرد.

### نتيجه‌گيرى

نتايج به دست آمده از اثر سيليبينين بر درصد زنده‌مانى ماموسفيرها نشان مى‌دهد که اين دارو مى‌تواند به صورت وابسته به دُز سبب کاهش درصد زنده‌مانى ماموسفيرها شود. در ضمن نتايج به دست آمده از اثر سيليبينين بر ويژگى‌های بنيادينگى از جمله توانايى تشکيل کلونى، توانايى اسفيرزايى، مارکرهای بنيادينگى و بيان ژن‌های بنيادينگى حاكى از اثر اين دارو در هدف گيرى سلول‌های بنيادى سرطان پستان به منظور جلوگيرى از عود مجدد سرطان باشد.

### سپاسگزارى

اين مطالعه حاصل حمايت مالى از طرف پژوهشگاه رويان و ستاد توسعه علوم و فناورى‌های سلول‌های بنيادى (معاونت فناورى رياست جمهورى) بوده و نويسندگان مراتب تقدير و تشکر خود را از مسئولين آن پژوهشگاه و ستاد ابراز مى‌دارند. از خانم پريسا صحرانورد به خاطر کمک‌هايشان کمال تشکر و امتنان را داريم.

تست‌های توانايى تشکيل کلونى (قابليت کلونى‌زايى سلول‌های بنيادى سرطان در شرايط تراکم بسيار کم سلولى) و همچنين توانايى رشد و تکثير سلول‌ها در کشت معلق، بدون سرم و با حضور فاکتورهای رشد EGF، bFGF و B27 (اسفيرزايى) از جمله تست‌هایی هستند که در آزمایشگاه، توانايى خودنوزايى سلول‌های بنيادى سرطان را نشان مى‌دهند (۲۶-۲۹).

همان‌طور که در نتايج ذکر شد، توانايى تشکيل کلونى و اسفير در ماموسفيرهای حاصل از سلول‌های رده MCF-7 پس از تيمار با دُز IC50 سيليبينين به طور معنی‌دارى کاهش يافته و سيليبينين علاوه بر کاهش تعداد کلونى‌ها و اسفيرهای تشکيل شده در گروه تيمار شده باعث کاهش ظاهرى اندازه کلونى‌ها و اسفيرها هم شده است. به اين ترتيب به نظر مى‌رسد که سيليبينين بر خواص بنيادينگى از جمله توانايى خودنوزايى اين سلول‌ها اثر مهارى داشته باشد. اين نتايج همسو با نتايج ديگر مطالعات، از جمله مطالعه Pegah Abdollahi و همکاران (۲۰۱۵) (۳۰) و مطالعه Majid Momeny و همکاران (۲۰۱۶) (۲۴) است که به دنبال تأثير سيليبينين کاهش کلونى‌زايى و اسفيرزايى را مشاهده کردند.

در انتها به منظور بررسى مکانيسم اثر سيليبينين بر ژن‌های بنيادينگى KLF4 و OCT4، بيان اين ژن‌ها به روش qRT-PCR بررسى شد. اين ژن‌ها که از اعضاء ياماناکا فاکتورها مى‌باشند، از تنظيم‌کننده‌های اساسى پرتوانى در سلول‌های بنيادى و سلول‌های بنيادى سرطان مى‌باشند (۳۱-۳۳). همچنين اين فاکتورها در تومورزايى، گسترش تومور، و مقاومت سلول‌های تومورى به داروها نقش دارند (۳۴)، نتايج مطالعه حاضر نشان داد که سيليبينين به طور معنی‌دارى باعث کاهش بيان ژن‌های بنيادينگى OCT4 و KLF4 مى‌شود. هم‌راستا با مطالعه ما مشخص شده است که سيليبينين مى‌تواند باعث



**References:**

- 1- Ablett MP, Singh JK, Clarke RB. *Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic?* Eur J Cancer 2012; 48(14): 2104-16.
- 2- Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F and et al. *Increased trend of breast cancer mortality in Iran.* Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(1): 367-70.
- 3- Vinogradov S, Wei X. *Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine.* Nanomedicine (Lond) 2012; 7(4): 597-615.
- 4- Chen K, Huang YH, Chen JL. *Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges.* Acta Pharmacol Sin 2013; 34(6): 732-40.
- 5- Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. *Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy.* Acta Pharmacol Sin B 2013; 3(2): 65-75.
- 6- Abbott A. *Cell culture: biology's new dimension.* Nature 2003; 424(6951): 870-2.
- 7- Kunz Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model.* J Biomol Screen 2004; 9(4): 273-85.
- 8- Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R and et al. *A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay.* J Biomol Screen 2007; 12(7): 925-37.
- 9- Gudjonsson T, Rønnov-Jessen L, Villadsen R, Bissell MJ, Petersen OW. *To create the correct microenvironment: three-dimensional heterotypic collagen assays for human breast epithelial morphogenesis and neoplasia.* Methods 2003; 30(3): 247-55.
- 10-Aggarwal BB, Danda D, Gupta S, Gehlot P. *Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promise.* Biochem Pharmacol 2009; 78(9): 1083-94.
- 11-Yin SY, Wei WC, Jian FY, Yang NS. *Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013, 15 pages.
- 12-Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. *Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment.* Adv Pharm Bull 2014; 4(1): 421-7.
- 13-Ohnishi S, Takeda H. *Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects.* Front Pharmacol 2015; 6: 14.
- 14-Wellington K, Jarvis B. *Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders.* BioDrugs 2001; 15(7): 465-89.
- 15-Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, Agarwal C, Agarwal R. *Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice and increases plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels.* Cancer res 2002; 62(11): 3063-9.
- 16-Singh RP, Tyagi AK, Zhao J, Agarwal R. *Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin*

- tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis.* Carcinogenesis 2002; 23(3): 499-510.
- 17-Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. *Silibinin induces apoptosis and inhibits proliferation of estrogen receptor (ER)-negative breast carcinoma cells through suppression of nuclear factor kappa B activation.* Arch Iran Med 2014; 17(5): 366.
- 18-Ramasamy K, Agarwal R. *Multitargeted therapy of cancer by silymarin.* Cancer let 2008; 269(2): 352-62.
- 19-Zhou J. *MCF7 side population cells and sphere culture as models for breast cancer stem-like cell biology and drug identification.* The Johns Hopkins University 2008; 159 pages.
- 20-de la Mare JA, Sterrenberg JN, Sukhthankar MG, Chiwakata MT, Beukes DR, Blatch GL and et al. *Assessment of potential anti-cancer stem cell activity of marine algal compounds using an in vitro mammosphere assay.* Cancer Cell Int 2013; 13(1): 39.
- 21-Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X and et al. *Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors.* J Thorac Dis 2014; 6(6): 829-37.
- 22-Ge Y, Zhang Y, Chen Y, Li Q, Chen J, Dong Y and et al. *Silibinin causes apoptosis and cell cycle arrest in some human pancreatic cancer cells.* Int J Mol Sci 2011; 12(8): 4861-71.
- 23-Wang YX, Cai H, Jiang G, Zhou TB, Wu H. *Silibinin inhibits proliferation, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via STAT3 pathway inhibition.* Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(16): 6791-8.
- 24-Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA nad 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): 8271-82.
- 25-Corominas Faja B, Oliveras Ferraros C, Cuyàs E, Segura Carretero A, Joven J, Martin Castillo B and et al. *Stem cell-like ALDH bright cellular states in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: A novel mechanism of acquired resistance to erlotinib targetable with the natural polyphenol silibinin.* Cell cycle 2013; 12(21): 3390-404.
- 26-Kumar S, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. *Silibinin strongly inhibits the growth kinetics of colon cancer stem cell-enriched spheroids by modulating interleukin 4/6-mediated survival signals.* Oncotarget 2014; 5(13): 4972.
- 27-Momeny M, Ghasemi R, Valenti G, Miranda M, Zekri A, Zarrinrad G and et al. *Effects of silibinin on growth and invasive properties of human ovarian carcinoma cells through suppression of heregulin/HER3 pathway.* Tumour Biol 2016; 37(3): 3913-23.
- 28-Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach.* Nat Protoc 2009; 4(3): 309-24.
- 29-Wang YJ, Bailey JM, Rovira M, Leach SD. *Sphere-forming assays for assessment of benign and malignant*

- pancreatic stem cells*. Methods Mol Biol 2013; 980: 281-90.
- 30-Morata-Tarifa C, Jiménez G, García MA, Entrena JM, Griñán-Lisón C, Aguilera M and et al. *Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells*. Sci Rep 2016; 6: 18772.
- 31-Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N and et al. *CD44 high CD24 low molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Stem Cell Res 2016; 16(2): 405-17.
- 32-Abdollahi P, Ebrahimi M, Motamed N, Samani FS. *Silibinin affects tumor cell growth because of reduction of stemness properties and induction of apoptosis in 2D and 3D models of MDA-MB-468*. Anticancer Drugs 2015; 26(5): 487-97.
- 33-Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. *Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells*. World J Stem Cells 2015; 7(9): 1150-84.
- 34-Lin YC, Murayama Y, Hashimoto K, Nakamura Y, Lin CS, Yokoyama KK and et al. *Role of tumor suppressor genes in the cancer-associated reprogramming of human induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Res Ther 2014; 5(2): 58.
- 35-Friedmann Morvinski D, Verma IM. *Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells*. EMBO Rep 2014: e201338254.
- 36-Ni J, Cozzi P, Hao J, Duan W, Graham P, Kearsley J and et al. *Cancer stem cells in prostate cancer chemoresistance*. Curr Cancer Drug Targets 2014; 14(3): 225-40.
- 37-Chang YC, Jan CI, Peng CY, Lai YC, Hu FW, Yu CC. *Activation of microRNA-494-targeting Bmi1 and ADAM10 by silibinin ablates cancer stemness and predicts favourable prognostic value in head and neck squamous cell carcinomas*. Oncotarget 2015; 6(27): 24002.
- 38-Raina K, Kumar S, Dhar D, Agarwal R. *Silibinin and colorectal cancer chemoprevention: a comprehensive review on mechanisms and efficacy*. J Biomed Res; 30(6): 452-65.

## Evaluation of Inhibitory Effect of Silibinin on Growth and Stemness Property of MCF-7 Cell Line Derived Mammospheres

Javad Firouzi<sup>1</sup>, Marzieh Ebrahimi<sup>2</sup>, Fattah Sotoodehnejad Nematalahi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS) and Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Stem Cells & Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Received:** 29 Oct 2016

**Accepted:** 9 Mar 2017

### Abstract

**Introduction:** The cancer stem cells are the small population of cells in tumor tissue with the ability of self-renew and differentiation into other tumor cells. Targeting these cells has great importance in the treatment of cancer and prevent cancer recurrence. Milk thistle is the plant of the Asteraceae with the scientific name of *Silybum Marianum*. However there is no report about the effect of Silibinin on mammospheres. So, the aim of this study was to evaluate the effect of silibinin on the ability of self-renewal, growth and stemness genes expression and markers of MCF-7 cell line derived mammospheres.

**Methods:** In this study, the viability of the MCF7 derived mammospheres were treated with silibinin for 72h using MTS test and 50% lethal dose (IC<sub>50</sub>) have been evaluated, respectively. Next, untreated and treated mammospheres with silibinin were investigated for the ability of invasion, colony and sphere formation, expression of stemness genes expression includes Oct4 and KLF by real time PCR.

**Results:** Our data showed that silibinin decreased the MCF-7 cells in the mammospheres with a dose dependent manner. Silibinin at dose of 150  $\mu$ M (IC<sub>50</sub>) reduced 4.6 and 11.2 fold the ability of sphere and colony formation respectively. Also invasion and expression of stemness genes significantly decreased.

**Conclusion:** Due to reduction of growth, colony and sphere formation, as well as reduction of invasion and expression of stemness genes, Silibinin can be a good candidate for targeting of cancer stem cells.

**Key words:** Cancer Stem Cells; Silibinin; Mammospheres; Viability

### This paper should be cited as:

Firouzi J, Ebrahimi M, Sotoodehnejad Nematalahi F. **Evaluation of Inhibitory Effect of Silibinin on Growth and Stemness Property of MCF-7 Cell Line Derived Mammospheres.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(2): 111-22.

\*Corresponding author: Tel: +98 2123562516, email: mebrahimi@royaninstitute.org