Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.2, May 2017
Pages: 111-122

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۹۶
صفحه: ۱۲۲-۱۱۱

بررسی اثر مهاری سیلیبینین بر رشد و خواص بنیادینگی مامواسفیرهای حاصل از سلول‌های رده MCF-7

جواد فیروزی[۱]، مرضیه ابراهیمی*[۲]، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی[۳]

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. سیلیبینین 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 بنیادینگی سلول‌های بنیادی سرطان وجود دارد، لذا هدف این مطالعه بررسی اثر سیلیبینین بر توانایی خودنوزایی، رشد، بیان شاخص‌ها و ژن‌های بنیادینگی مامواسفیرهای حاصل از سلول‌های رده MCF-7 است.

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

نتایج: سیلیبینین به صورت وابسته به دُز سبب کاهش سلول‌های MCF-7 در مامواسفیرها شد. سیلیبینین در دُز ۱۵۰ میکرومولار (IC50) سبب کاهش۴/۶ برابری توانایی تشکیل اسفیر، کاهش ۱۱/۲ برابری توانایی تشکیل کلونی و کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۸) تهاجم و بیان ژن‌های بنیادینگی شد.

نتیجه‌گیری: سیلیبینین با کاهش رشد، کلونی زایی، اسفیرزایی، تهاجم و همچنین کاهش بیان ژنهای بنیادینگی می‌تواند کاندید مناسبی برای هدف‌گیری سلول‌های بنیادی سرطان باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی سرطان، سیلیبینین، مامواسفیر، توانایی زیستی

۱- کارشناس، زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی ، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم داروئی 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 دریافت: ۱۳۹۵/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

سرطان پستان به عنوان یک سرطان هتروژن که از زیرمجموعه‌های سلولی با ویژگی‌های متفاوتی تشکیل شده است (۱)، عامل بیشترین مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان در ایران و کشورهای توسعه یافته است (۲). مطالعات دهه‌های اخیر نشان داده‌اند که جمعیت کوچکی از سلول‌های بافت توموری، با قابلیت خودنوزایی، مسئول رشد و گسترش تومور می‌باشند. این سلول‌ها مقاوم به دارو بوده و مسئول عود مجدد سرطان و متاستاز به دنبال درمان‌های رایج و متداول می‌باشند (۵-۳) به این ترتیب یافتن راه‌هایی که علاوه بر هدف‌گیری سلول‌های توموری، سلول‌های بنیادی تومور را نیز هدف می‌گیرند، ضروری است.

تومورهای جامد در بدن موجودات زنده به صورت ساختارهای فضایی سه‌بعدی رشد می‌کنند و سلول‌های سرطانی موجود در این بافت‌های توموری به صورت ناهمسان در معرض استرس‌ها، فشارهای فیزیکی، داروها، اکسیژن و مواد غذایی قرار می‌گیرند و طبیعتاً نفوذ داروها، اکسیژن و مواد غذایی به سلول‌های مختلف بافت توموری یکسان نخواهد بود. سلول‌هایی که در نواحی داخلی تر بافت توموری قرار دارند، به میزان کمتری در معرض مواد گفته شده قرار می‌گیرند (۶). بنابراین کشت سلول‌ها به صورت تک لایه ساختار سلول‌ها در بافت توموری را بازسازی نمی‌کند (۷)، اما در کشت سه‌بعدی، تعامل بین سلول‌ها به گونه‌ای است که ساختار سلولی، چسبندگی بین سلول‌ها و همچنین مسیرهای پیام‌رسانی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۸). در واقع کشت سلول‌ها به صورت ساختارهای سه بعدی می‌تواند اطلاعاتی از سلول‌های موجود در بافت توموری را در اختیار محققین قرار دهد که با استفاده از کشت‌های تک لایه دسترسی به آن اطلاعات امکان‌پذیر نیست (۹).

با توجه به اینکه استفاده از مدل‌های حیوانی در تحقیقات سرطان، علاوه بر گران بودن، وقت‌گیر بوده و با مشکلات فراوانی همراه است (۱۰). بنابراین استفاده از مدل‌های ۳ بعدی کشت سلول می‌تواند در حل برخی از مشکلات همچون نقص در رسیدن دارو به سلول‌های بنیادی سرطان، غربالگری و ایمنی مفید واقع شود. ماموا‌سفیرهای توموری حاصل کشت سلول‌های سرطانی در سطح غیر چسبنده و بدون سرم هستند و مدلی برای کشت ۳ بعدی سلول‌های سرطانی محسوب می‌شوند. لذا در این مطالعه از مدل ماموا‌سفیر برای غنی‌سازی سلول‌های بنیادی سرطان و نیز الگویی برای کشت سه بعدی سلول‌های توموری استفاده شد.

امروزه عوامل داروئی حاصل از گیاهان و یا مکمل‌های درمانی مشتق از آن‌ها، می‌توانند برای هدف‌گیری سلول‌های بنیادی سرطان مورد آزمون قرار گیرند، یکی از مزایای مهم این عوامل این است که برخلاف داروهای شیمیایی، سمیت کمتری برای سلول‌ها دارند (۱۳-۱۱). سیلیمارین و ماده اصلی تشکیل‌دهنده آن، سیلیبینین که از عصاره گیاه خار مریم از تیره کاسنی با نام علمی Sylybum Marianum به دست می‌آیند، از قدیم در درمان بیماری‌های زیادی به‌خصوص در درمان بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است و اثرات درمانی مؤثری دارد، همچنین این دارو اثرات جانبی بسیار کمی دارد به طوری که غلظت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آن نیز فاقد اثرات جانبی در انسان و جوندگان بوده است (۱۴-۱۶). این ترکیب می‌تواند توسط مکانیسم‌های متفاوت از جمله تنظیم چرخه سلولی، مهار رگزائی، مهار تهاجم و متاستاز، بسیاری از وقایع مولکولی را بدون بر جای گذاشتن اثرات سمی تحت تأثیر قرار دهد (۱۷, ۱۸)، لذا در درمان سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پروستات، کولون و سایر سرطان‌ها به عنوان داروی ضد سرطان پیشنهاد شده است.

گزارش‌هایی در خصوص اثرات ضد سرطانی سیلیبینین وجود دارد، اما هیچ گزارشی مبنی بر بررسی اثرات سیلیبینین بر سلول‌های بنیادی سرطان پستان در قالب ماموا‌سفیرها وجود ندارد. لذا در این مطالعه اثر سیلیبینین را بر رشد، بنیادینگی و قدرت تهاجم و مهاجرت ماموا‌سفیرهای حاصل از رده تومری MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات آزمایشگاهی مداخله‌ای است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 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 CO2 ۵٪ و دمای ۳۷° سانتی‌گراد نگهداری شدند، جهت جدا کردن سلول‌ها از سطح ظرف کشت، از محلول Tripsine/EDTA استفاده شد، DMEM، L-Gutamine، 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 پلی هما (2-hydroxyethyl metha- crylate) (Poly-HEMA; Sigma, St Louis, Missouri, USA) با غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ پوشیده شد. $۱۵×۱۰^{۳}$ 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 فیبروبلاستی پایه (basic fibroblast growth factor) (Royan Institute, Tehran, Iran)(bFGF)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (epidermal growth factor) (Royan Institute, Tehran, Iran)(EGF) و ۲٪ B27 (Gibco)، (محیط کشت ماموا‌سفیر)، کشت شد.

سنجش زنده‌مانی سلول‌ها در کشت ماموا‌سفیر با استفاده از آزمون MTS: $۱۰^{۲}$ × ۱۵ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف پوشیده شده با پلی هما، در ۱۰۰ میکرولیتر محیط ماموا‌سفیر کشت شد. ۹۶ ساعت بعد، طبق دستورالعمل، سیلیبینین (sigma, S0۴۱۷) در اتانول مطلق حل شد و مقدار مساوی از همان محیط کشت به تنهایی یا به علاوه غلظت‌های مختلف سیلیبینین (۰ تا ۱۶۰۰ میکرومولار) به چاهک‌ها اضافه و ۷۲ ساعت در شرایط CO2 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 CO2) 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 طول‌موج ۴۹۰ نانومتر سنجیده شد، نهایتاً درصد زنده مانی ماموا‌سفیرها با استفاده از فرمول زیر محاسبه و غلظتی از سیلیبینین که سبب ۵۰ درصد کشندگی ماموا‌سفیرها شد، به عنوان IC50 (% 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.

$$\text{درصد زنده مانی ماموا‌سفیرها} = \frac{\text{میانگین جذب نمونه‌های تیمار شده با هر غلظت از سیلیبینین}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار نشده فاقد سیلیبینین}} \times ۱۰۰$$

آزمایش توانایی تشکیل کلونی: ۲۰۰ سلول از ماموا‌سفیرهای گروه تیمار نشده و ماموا‌سفیرهای تیمار شده با غلظت IC50 از سیلیبینین در هر چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ FBS کشت و به مدت ۱۰ روز در شرایط CO2 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 ۰/۰۵٪ 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 سیلیبینین، با تراکم

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

۱۵۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای پوشیده شده با پلی هما و در محیط ماموا‌سفیر کشت و بعد از ۷ روز ماموا‌سفیرهای 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 پلی کربنات حاوی منافذ ۸/۰ 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 ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پوشش داده شده‌اند مورد استفاده قرار گرفتند، سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱۲۵×۱۰^{۳} سلول در میلی‌لیتر از ماموا‌سفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با غلظت IC50 از سیلیبینین، 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 °۳۷ و ۵ ٪ CO2 انکوبه شدند. سلول‌های باقی‌مانده در قسمت داخلی فیلترها را با استفاده از سواپ پنبه‌ای برداشته و سلول‌های چسبیده به قسمت پایینی فیلترها، با پارافرم آلدهید ۴ ٪ به مدت ۱ ساعت و در دمای °۴ تثبیت و سپس با استفاده از کریستال ویوله ۰/۵ ٪ 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 X ۲۰ 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.

بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی با استفاده از تکنیک Real time PCR: با استفاده از ترایزول (Invitrogen)، mRNA تام از ماموا‌سفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین استخراج شد. با استفاده از کیت سنتز cDNA، RevertAid H Minus First Strand (TAKARA, PR037A)، آنزیم 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 ($\Delta\Delta Ct$).

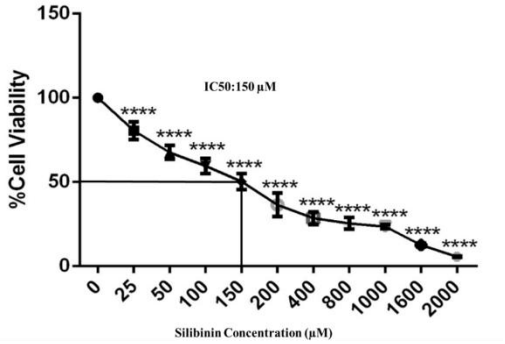
مطالعات آماری: مطالعات آماری این مقاله با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 6 و با آزمون‌های t test و 2 way ANOVA انجام گرفت. درجه معنی‌داری $p<۰/۰۰۱$ در نظر گرفته شده است. کد اخلاق اخذ شده از کمیته اخلاق ۹۴۰۰۰۳۱ می‌باشد.

نتایج

بررسی اثر سیلیبینین بر درصد زنده‌مانی ماموا‌سفیرهای مشتق از رده توموری MCF-7: ماموا‌سفیرها با استفاده از غلظت‌های مختلف سیلیبینین (۰-۲۰۰۰ μM) تیمار شده و میزان زنده مانی آن‌ها توسط تست آزمون MTS پس از ۷۲ ساعت مطابق با آنچه در بالا توضیح داده شده، محاسبه گردید. دُز ۵۰ درصد کشندگی (IC50) به عنوان دُز منتخب برای ادامه مطالعه استفاده شد.

نتایج نشان داد که سیلیبینین در یک روش وابسته به دُز، سبب کاهش درصد زنده مانی سلول‌ها می‌شود (نمودار ۱). دُز ۱۵۰ میکرومولار سیلیبینین به عنوان دُزی انتخاب شد که موجب ۵۰ درصد کاهش زنده مانی می‌شود.

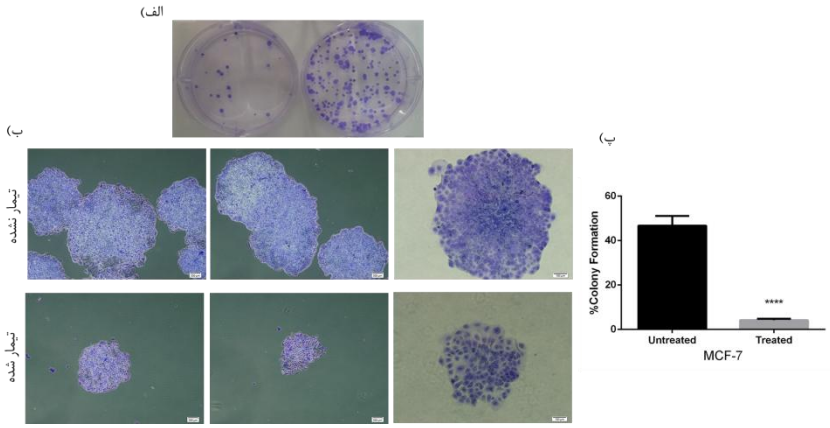
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



نمودار۱: درصد زنده مانی ماموسفیرها پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیبینین

ماموسفیرهای مشتق از رده MCF-7 توسط سیلیبینین در غلظت‌های µM ۲۰۰۰-۰ 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<۰۱/۰۰۰۱ است).

بررسی توانایی تشکیل کلونی توسط سلول‌های ماموسفیر تیمار شده و تیمار نشده با سیلیبینین: سلول‌های بنیادی سرطان قدرت خودنوزائی 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 به‌راحتی 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 مشتق از رده MCF-7 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اجرای تست از دُز IC50= ۱۵۰ µM 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<۰/۰۰۰۱).

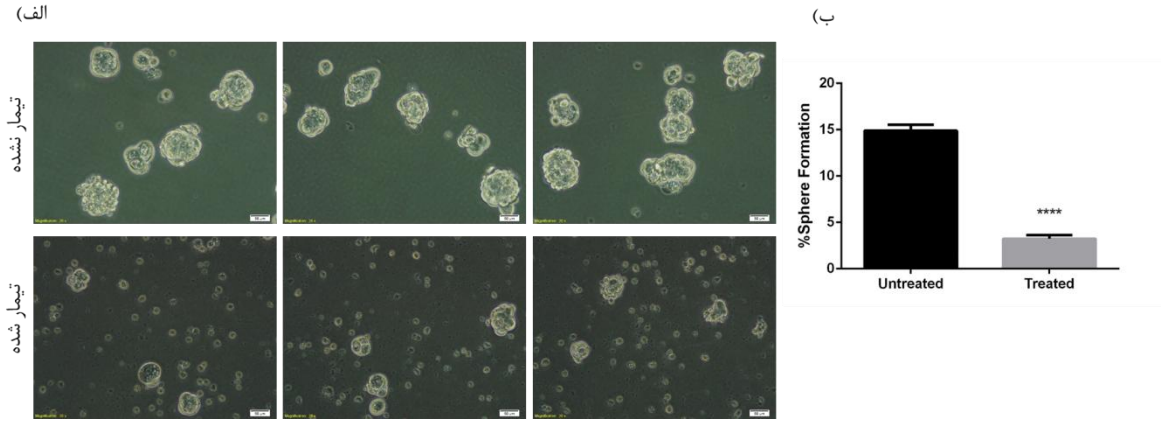


شکل۱: سنجش قدرت کلونی زایی در سلول‌های ماموسفیر تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین

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 ۱۵۰µM سیلیبینین بعد از ۱۲ روز. پ) مقایسه درصد کلونی زایی سلول‌های حاصل از ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار سیلیبینین را نشان می‌دهد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند. علامت **** نشان‌دهنده p< ۰/۰۰۰۱ می‌باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

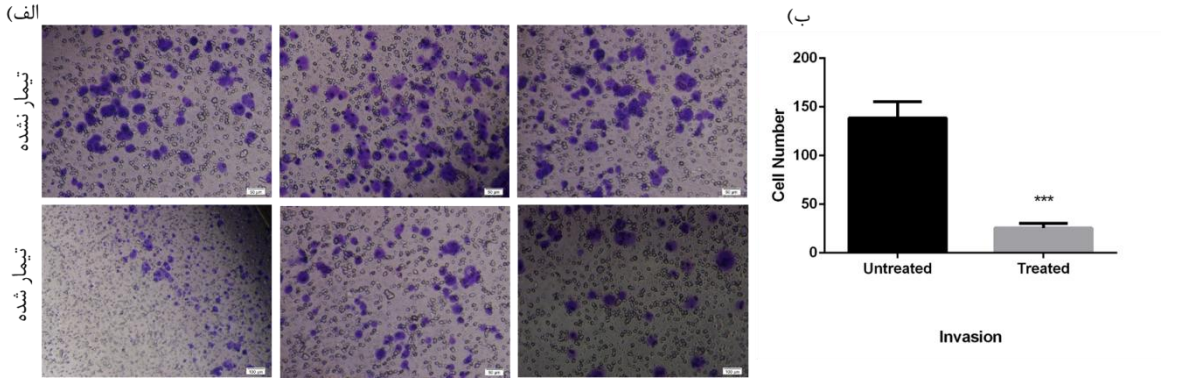
آزمایش توانایی تشکیل اسفیر (اسفیرزایی): یکی دیگر از تست‌هایی که توان خونوزایی سلول‌ها را در آزمایشگاه نشان می‌دهد، توانایی تشکیل اسفیر در محیط فاقد سرم و در ظرف کشت فاقد چسبندگی است. نتایج تست اسفیرزایی به دنبال تیمار ماموا‌سفیرها با دُز ۱۵۰ μM سیلیبینین نشان داد که سلول‌های حاصل از ماموا‌سفیرهای تیمار 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. (شکل۲ب، p<۰/۰۰۰۱).



شکل۲: سنجش قدرت اسفیرزایی در سلول‌های ماموا‌سفیر تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین

الف) اسفیرهای تشکیل شده توسط سلول‌های حاصل از ماموا‌سفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین را بعد از ۷ روز نشان می‌دهد، ب) مقایسه درصد اسفیرزایی سلول‌های حاصل از ماموا‌سفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین را نشان می‌دهد، دُز ۱۵۰ میکرومولار سیلیبینین سبب کاهش تعداد اسفیرها به میزان ۴/۶ برابر نسبت به گروه تیمار نشده شد، نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده‌شده‌اند علامت **** نشان‌دهنده p<۰/۰۰۰۱ است.

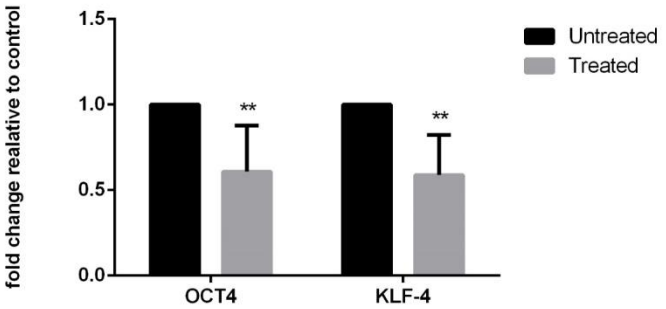
بررسی توانایی تهاجم سلول‌های ماموا‌سفیر تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین: سلول‌های بنیادی سرطان از جمله اصلی‌ترین سلول‌هایی هستند که در تهاجم سرطان نقش دارند، لذا پتانسیل تهاجم را به عنوان یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان معرفی کرده‌اند. بر این اساس در مطالعه حاضر توانایی تهاجم سلول‌های ماموا‌سفیر تیمار نشده و تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار (IC50) از سیلیبینین مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که در شکل۳ (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< ۰/۰۰۰۸).



شکل ۳:الف) سلول‌های تهاجم کرده حاصل از ماموا‌سفیرهای تیمار نشده و تیمار شده را بعد از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله نشان می‌دهد، ب) مقایسه تعداد سلول‌های دارای پتانسیل تهاجم را در ماموا‌سفیرها تیمار نشده و تیمار شده با دُز ۱۵۰ میکرومولار از سیلیبینین را نشان می‌دهد. سیلیبینین باعث کاهش ۶/۳ برابری تعداد سلول‌های دارای پتانسیل تهاجم، در گروه تیمار شده نسبت به گروه تیمار نشده شد (p<۰/۰۰۰۸). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از آنالیز t test سه تکرار بیولوژیک نشان داده‌شده‌اند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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 (دُز۱۵۰ μM) توسط qRT-PCR 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<۰/۰۰۰۱) در بیان ژن‌های OCT4 (۲/۳ برابر) و KLF4 (۴/۸ برابر) شد.



نمودار۲: بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی در ماموسفیرهای تیمار نشده و تیمار شده با سیلیبینین توسط qRT-PCR
سیلیبینین باعث کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) در بیان ژن‌های OCT4 و KLF4 (به ترتیب ۲/۳ و ۴/۸ برابر) نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از آنالیز 2way ANOVA سه تکرار بیولوژیک نشان داده شده‌اند. علامت** نشانه p< ۰/۰۰۱ است.

بحث

در این مطالعه اثر مستقیم سیلیبینین بر ماموسفیرهای حاصل از رده توموری MCF-7 (آدنوکارسینومای 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 سوبسترا 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 تشکیل‌دهنده آن‌ها به دنبال تیمار داروئی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. اگرچه مکانیسم اثر بر رشد مامئسفیرها 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 مهاری 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 × b)1/2 (a و b قطرهای قائم ماموسفیرها هستند) محاسبه شده، به‌خوبی میانکنش‌های سلول – سلول و سلول – ماتریکس را بازسازی می‌کند (۲۵)، لذا به نظر می‌رسد با استفاده از دُز IC50 به دست آمده بتوان به تخمین درستی جهت رسیدن به دُز مناسب مورد استفاده در شرایط in vivo رسید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

تست‌های توانایی تشکیل کلونی (قابلیت کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی سرطان در شرایط تراکم بسیار کم سلولی) و همچنین توانایی رشد و تکثیر سلول‌ها در کشت معلق، بدون سرم و با حضور فاکتورهای رشد EGF ، bFgF و B27 (اسفیرزایی) از جمله تست‌هایی هستند که در آزمایشگاه، توانایی خودنوزایی سلول‌های بنیادی سرطان را نشان می‌دهند (۲۶-۲۹).

همان‌طور که در نتایج ذکر شد، توانایی تشکیل کلونی و اسفیر در مامواسفیرهای حاصل از سلول‌های رده MCF-7 پس از تیمار با دُز IC50 سیلیبینین به طور معنی‌داری کاهش یافته و سیلیبینین علاوه بر کاهش تعداد کلونی‌ها و اسفیرهای تشکیل شده در گروه تیمار شده باعث کاهش ظاهری اندازه کلونی‌ها و اسفیرها هم شده است. به این ترتیب به نظر می‌رسد که سیلیبینین بر خواص بنیادینگی از جمله توانایی خودنوزایی این سلول‌ها اثر مهاری داشته باشد. این نتایج همسو با نتایج دیگر مطالعات، از جمله مطالعه Pegah Abdollahi و همکاران (۲۰۱۵) (۳۰) و مطالعه Majid Momeny و همکاران (۲۰۱۶) (۲۴) است که به دنبال تأثیر سیلیبینین کاهش کلونی‌زایی و اسفیرزایی را مشاهده کردند.

در انتها به منظور بررسی مکانیسم اثر سیلیبینین بر ژن‌های بنیادینگی KLF4 و OCT4، بیان این ژن‌ها به روش qRT-PCR بررسی شد. این ژن‌ها که از اعضاء یاماناکا فاکتورها می‌باشند، از تنظیم‌کننده‌های اساسی پرتوانی در سلول‌های بنیادی و سلول‌های بنیادی سرطان می‌باشند (۳۱-۳۳). همچنین این فاکتورها در تومورزایی، گسترش تومور، و مقاومت سلول‌های توموری به داروها نقش دارند (۳۴)، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سیلیبینین به طور معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی OCT4 و KLF4 می‌شود. هم‌راستا با مطالعه ما مشخص شده است که سیلیبینین می‌تواند باعث کاهش ژن‌های مربوط به بنیادینگی در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان سر و گردن (۳۵)، سرطان کولون (۲۳) و سرطان کولورکتال (۳۶) شود. البته در سرطان‌های مختلف نقش تنظیمی KLF4، وابسته به نوع بافت سرطانی می‌تواند مهارکننده و یا پیش برنده سرطان باشد.

نتایج مطالعه ما حاکی از اثرات مهاری سیلیبینین بر سلول‌های بنیادی در قالب مامواسفیرهای حاصل از حاصل از سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان است، به علاوه نتایج حاصل از اثر سیلیبینین بر مامواسفیرها قویاً پیشنهاد می‌کند اثرات آن را به‌ویژه در شرایط in vivo به منظور استفاده از آن به عنوان یک عامل مهارکننده سلول‌های بنیادی سرطان پستان مورد بررسی‌های بیشتری قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از اثر سیلیبینین بر درصد زنده‌مانی مامواسفیرها نشان می‌دهد که این دارو می‌تواند به صورت وابسته به دُز سبب کاهش درصد زنده‌مانی مامواسفیرها شود. در ضمن نتایج به دست آمده از اثر سیلیبینین بر ویژگی‌های بنیادینگی از جمله توانایی تشکیل کلونی، توانایی اسفیرزایی، مارکرهای بنیادینگی و بیان ژن‌های بنیادینگی حاکی از اثر این دارو در هدف گیری سلول‌های بنیادی سرطان پستان به منظور جلوگیری از عود مجدد سرطان باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل حمایت مالی از طرف پژوهشگاه رویان و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی (معاونت فناوری ریاست جمهوری) بوده و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن پژوهشگاه و ستاد ابراز می‌دارند. از خانم پریسا صحرانورد به خاطر کمک‌هایشان کمال تشکر و امتنان را داریم.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

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

Javad Firouzi[1], Marzieh Ebrahimi[2], Fattah Sotoodehnejad Nematalahi[3]

[1] 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
[2] Department of Stem Cells & Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology, ACECR, Tehran, Iran
[3] 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 Silibilin 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 (IC50) 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 mamospheres with a dose dependent manner. Silibinin at dose of 150 µM (IC50) 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; Silibilin; Mamospheres; 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**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]