Cytotoxic Effects of Silibinin in Combination with 5-Fluorouracil on HT29 Colorectal Cancer Cells

Bahman Moradipoodeh[1]

1.Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.Tell:01358532491, E. Mail: bmoradipoodeh@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0002-0430-666X

ABSTRACT

Background and Aim: Colorectal cancer is one of the most common types of cancer in the world, causing many deaths worldwide each year. 5-Fluorouracil is the first choice for the treatment of this type of cancer. Drug resistance and its many side effects are among the weaknesses of this drug. Silibinin, the main bioactive component of silymarin, is originally extracted from Silybum marianum, which is commonly used as an anti-hepatic agent. In recent years, the anticancer effect of silibinin has been observed on different cancer cells. This study aimed to investigate the combined cytotoxic effects of silibinin and 5-fluorouracil on cell viability and p53 expression in the colon cancer HT29 cell line .

Material and Methods: Survival of HT29 cells was evaluated by the MTT method after 48 hours of treatment with different concentrations of silibinin and 5 fluorouracil alone and in combination. The expression level of the P53 protein was measured by Western blot method.

Results: Silibinin and 5-fluorouracil significantly inhibited HT29 cell survival in a dose-dependent manner. The simultaneous use of silibinin and 5-fluorouracil showed that silibinin enhances the cytotoxic effects of 5-fluorouracil. In addition, 100 µg/ml silibinin enhanced the impact of 100 µM 5-fluorouracil on P53 protein expression .

Conclusion: This study suggested that silibinin-5-fluorouracil combination may be a valuable candidate for colon cancer patients. Of course, further studies are needed to reach definitive conclusion.

Keywords: Colorectal cancer, Silibinin, 5-fluorouracil, P53 protein, HT29 cell line

Received: Jan18,2024 **Accepted**: June 24,2024

How to cite the article: Bahman Moradipoodeh, Cytotoxic Effects of Silibinin in Combination with 5-Fluorouracil on HT29 Colorectal Cancer Cells SJKU 2025;29(6):1-12.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و نه / بهمن و اسفند ۱۴۰۳/۱۲-۱

سیلیبینین در ترکیب با ۵– فلوروواوراسیل اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال را تقویت می‌کند

بهمن مرادی پوده[1]

۱. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. پست الکترونیک: bmoradipoodeh@yahoo.com، تلفن: ۰۱۳-۵۸۵۳۸۲۴۹۱ کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۴۳۰-۶۶۶X

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از سرطان‌های رایج در دنیا است که سالانه باعث مرگ‌ومیر زیادی در جهان می‌شود. داروی ۵-فلوئوروواوراسیل به‌عنوان خط اول درمان در این نوع سرطان است. مقاومت به این دارو و عوارض جانبی متعددش از نقاط ضعف این دارو به‌حساب می‌آید. سیلیبینین جزء فعال زیستی اصلی سیلیمارین است و از گیاه خار مریم استخراج می‌شود، مخلوطی از پلی فلاونوئیدها است و به‌طور سنتی به‌عنوان یک عامل ضد کبدی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر اثرات ضد توموری سیلیبینین در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گزارش‌شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک سیلیبینین در ترکیب با ۵-فلوئوروواوراسیل بر روی زنده ماندن سلولی و بیان P53 در رده سلولی سرطان کولورکتال HT29 انجام شد.

مواد و روش‌ها: بقای سلولی سلول‌های HT29 با روش MTT پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیبینین و ۵-فلوئوروواوراسیل به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی ارزیابی شد. میزان بیان پروتئین P53 با روش وسترن‌بلات اندازه‌گیری شد.

نتایج: سیلیبینین و ۵-فلوئوروواوراسیل به‌صورت وابسته به دوز توانستند بقای سلولی HT29 را به‌طور معنی‌داری مهار کنند. استفاده هم‌زمان از تیمار سیلیبینین و ۵-فلوئوروواوراسیل نشان داد که سیلیبینین اثرات سیتوتوکسیک ۵-فلوئوروواوراسیل را تقویت می‌کند. همچنین سیلیبینین در غلظت۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، باعث تشدید در اثرات غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-فلوئوروواوراسیل بر روی میزان بیان پروتئین P53 شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ترکیب سیلیبینین – ۵-فلوئوروواوراسیل ممکن است کاندیدای ارزشمند برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال باشد؛ البته برای نتیجه‌گیری قطعی مطالعات بیشتری لازم است.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، سیلیبینین، ۵-فلوئوروواوراسیل، پروتئین P53، رده سلولی HT2

وصول مقاله:۱۴۰۲/۱۰/۲۸ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۳/۴/۲ پذیرش:۱۴۰۳/۴/۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

مقدمه

سرطان بیماری با رشد و تکثیر نامحدود سلول‌ها است که در آن سلول‌ها از قانون طبیعی تقسیم سلولی پیروی نمی‌کنند. سرطان کولورکتال (CRC) چهارمین سرطان شایع از نظر بروز (۶/۱ درصد از کل موارد) و دومین سرطان پیشرو از نظر مرگ‌ومیر (۹/۲ درصد از کل موارد) است (۳-۱). برای درمان افراد مبتلا به سرطان کولورکتال، علاوه بر جراحی از شیمی‌درمانی مبتنی بر ۵-فلوئوروواوراسیل (5-FU) به‌عنوان خط اول و درمان انتخابی شیمی‌درمانی استفاده می‌کنند. این دارو بعد از ورود به داخل سلول سرطانی به چندین متابولیت فعال مثل فلوئورو-دئوکسی یوریدین-مونوفسفات (FdUMP)، فلورودوکسی یوریدین- تری فسفات (FdUTP) و فلورو یوریدی تری فسفات (FUTP) تبدیل شده و از طریق مهار کردن آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS) و متعاقب آن مهار سنتز DNA باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردد (۵ و ۴). بااین‌حال، در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پیشرفته، نرخ پاسخ به 5-FU جزئی بوده و حتی درمان‌های ترکیبی با اگزالی پلاتین یا ایرینوتکان پاسخ‌های ناکافی ایجاد می‌کند و اکثر بیماران به این درمان‌ها پاسخ نمی‌دهند. از دیگر معایب استفاده از داروی 5-FU اثرات جانبی متعدد و مقاومت دارویی است که سلول‌های سرطانی نسبت به این داروها پیدا می‌کنند (۷ و۶). ترکیبات گیاهی متعددی شناسایی‌شده‌اند که دارای خاصیت از بین بردن سلول‌های سرطانی هستند. این ترکیبات گیاهی معمولاً دارای عوارض جانبی کم می‌باشند و در تحقیقات متعددی این ترکیبات را با درمان‌های مرسوم به‌صورت ترکیبی استفاده می‌کنند تا اثرات ثانویه داروهای معمول کاهش یابد (۱۰-۸). ترکیبات شیمیایی موجود در میوه‌ها و سبزی‌ها شامل جنیستئین، لیکوپن، کپسایسین، کورکومین، اسید الاژیک، اسید اورسولیک، سیلیمارین، کاتچین و سایر ترکیبات می‌باشند که دارای خاصیت ضد سرطانی هستند. سیلیبینین، جزء فعال زیستی اصلی سیلیمارین است که در اصل از گیاه خار مریم استخراج می‌شود، مخلوطی از پلی فلاونوئیدها است و به‌طور سنتی به‌عنوان یک عامل ضد کبدی استفاده می‌شود (۱۳-۱۱). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سیلیبینین دارای اثرات ضد توموری آشکار در برابر سلول‌های توموری مختلف مانند سرطان کبد، پروستات، کلیه، روده بزرگ، ریه و سرطان پوست است. این مطالعات نشان داده‌اند که سیلیبینین از مسیرهای مختلفی مثل القا آپپتوز باعث مرگ این سلول‌ها می‌گردد (۱۵ و ۱۴). در حال حاضر، مطالعات کار آزمایی بالینی سیلیبینین در انسان برای درمان سرطان پروستات در حال انجام است و یک مطالعه تکمیل‌شده در فاز I و II هیچ اثر سمی را نشان نداده است. ژن‌های متعددی در انسان شناسایی شده است و جهش در یک ژن باعث ایجاد سرطان نمی‌شود، بلکه سرطان وقتی به وقوع می‌پیوندد که جهش در ژن‌های کلیدی رخ دهد. ژن‌های کلیدی ۳ دسته‌اند: پروتوانکوژن‌ها، ژن‌ها سرکوب‌کننده تومور و ژن‌های ترمیم‌کننده‌ای DNA (۱۶). با توجه به اینکه در ایجاد سرطان ژن‌های زیادی درگیر هستند، یافتن ژن‌های نامزد برای درمان سرطان بسیار کلیدی است. یکی از مهم‌ترین ژن‌های هدف P53 است که به دلیل مشارکت آن در پهنه‌ی وسیعی از تومورها مورد توجه قرار گرفته است. این ژن در بازوهای کوتاه کروموزوم (17P 13.1) واقع است و درواقع بیش‌ترین هدف جهش در سرطان‌های انسانی است. در۲۰ تا ۲۵ درصد سرطان پستان و در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌های مثانه، کولون و ریه جهش‌هایی در ژن P53 مشاهده‌شده است. ژن P53 در حالت طبیعی به سلولی که DNA آن دچار آسیب شده باشد، فرمان توقف تکثیر می‌دهد تا آسیب وارده را اصلاح نماید و اگر سلول نتواند آسیب وارده را اصلاح نماید، فرمان آپوپتوز را صادر می‌کند. اگر ژنP53 آسیب ببیند و عملکردش مختل شود، سلولی که DNA آن آسیب دیده به تکثیر خود ادامه می‌دهد و سلول‌های غیرطبیعی بیشتری تولید می‌شود. به همین دلیل به P53 نسبت نگهبان ژنوم داده‌اند که با اعمال اثرات خود در مرحله G1-S از چرخه سلولی، از سلول در برابر آسیب حمایت می‌کند در نتیجه پروتئینP53 می‌تواند اثرات ضد تکثیری خود را از طریق مهار چرخه سلول،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

آپوپتوز و پیری سلول در پاسخ به محرک‌های مختلف داخل سلولی و خارج سلولی مانند آسیب به DNA بر اثر استفاده از پرتوهای یونیزاسیون اشعه UV و استفاده از داروهای شیمی‌درمانی، ویروس‌های عفونی، شوک حرارتی و هیپوکسی اعمال کند (۲۰-۱۷).

از آنجایی که مطالعات محدودی به بررسی اثر هم‌زمان 5-FU و سیلیبینین بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال به ویژه HT29 صورت گرفته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک سلیبینین در ترکیب با ۵-فلورواوراسیل بر روی زنده ماندن سلولی و بیان P53 در رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی HT29 به منظور کاهش دادن دوز داروی 5-FU انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه پودر سیلیبینین، پودر MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین-استرپتومایسین از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا خریداری شد. محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و همچنین (Fetal Bovine Serum) FBS از شرکت Gibco، آنتی‌بادی مونوکال خرگوشی آنتی P53 (ab32503) از شرکت Abcam، آنتی‌بادی مونوکال خرگوشی آنتی بتا-اکتین (ab32503) و آنتی‌بادی ضد خرگوشی IgG لیبل شده با HRP (4970L) از شرکت Cell Signaling، همچنین کیت ECL از شرکت Bio-Rad و همچنین رده سلولی HT29 از موسسه پاستور ایران خریداری شدند.

شرایط کشت سلولی

رده سلولی سرطان کولورکتال HT29 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شد. برای کشت دادن این سلول‌ها از محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و ۰.۵٪ پنی سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند.

کشت سلولی و سنجش سمیت سلولی

تعداد تقریبی ۶×۱۰^{۳} از سلول‌های HT29 در پلیت‌های ۹۶ خانه بعد از پاساژ سوم کشت داده شدند. بعد از انکوبه شدن شبانه به‌منظور اتصال سلول‌ها به ته چاهک، به‌منظور ارزیابی سمیت سلولی سیلیبینین و 5-FU، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیلیبینین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و 5-FU (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرو مول بر لیتر) به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی به مدت ۴۸ ساعت، تیمار شدند. هر دو ماده در حلال DMSO (Dimethylsulfoxide) حل شدند. سلول‌های گروه کنترل در هر گروه بدون تیمار باقی ماندند. بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها، محیط کشت از سطح سلول‌ها با سمپلر خارج شد و به میزان ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. محلول اضافه‌شده تا زمان ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ به زمان تقریبی ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول زرد رنگ رویی بعد از تشکیل کریستال با سمپلر به آرامی و با دقت برداشته شد. در انتها برای حل کردن کریستال‌ها به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر محلول حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. میزان جذب نوری سلول‌ها با دستگاه الایزا ریدر BioTek ELX800 (Winooski، ایالات‌متحده) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر بعد از حل شدن کریستال‌ها قرائت شد.

وسترن بلاتینگ

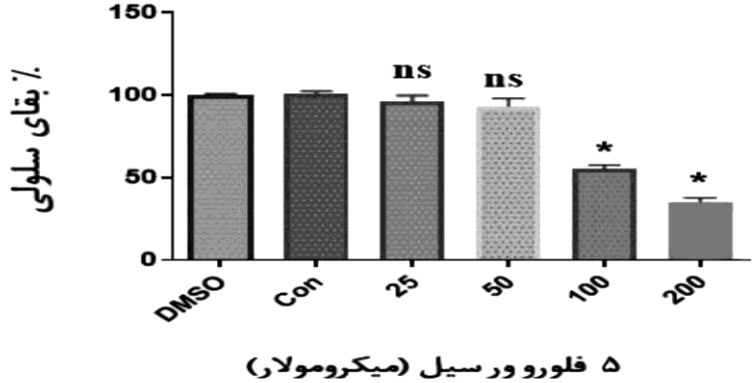
تعداد تقریبی ۳×۱۰^{۵} از سلول‌های HT29 در پلیت‌های ۶ خانه بعد از پاساژ سوم کشت داده شدند. بعد از انکوبه شدن شبانه به‌منظور اتصال سلول‌ها به ته چاهک، محیط کشت رویی برداشت شد و سپس این سلول‌ها با داروهای سیلیبیلین و 5-FU به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی با غلظت مشخص به سلول‌ها تیمار شدند. پس از اتمام مدت زمان تیمار سلول‌ها، پلیت‌های حاوی سلول‌ها از انکوباتور به روی یخ منتقل شد و محیط رویی سلول‌ها به‌طور کامل با سمپلر برداشت شد. بعدازاین مرحله، سلول‌ها به آرامی با PBS سرد و استریل شستشو داده شدند. به‌منظور استخراج پروتئین‌ها، از ۱۰۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

میکرو لیتر بافر لیز کننده (RIPA) حاوی مهارکننده پروتئاز برای هر چاهک استفاده شد. سپس سلول‌های جداشده از کف پلیت جمع‌آوری شد و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور۱۶۰۰۰rpm در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از محلول رویی موجود در میکروتیوب برای تعیین غلظت پروتئین به روش لوری استفاده شد. بعد از تعیین غلظت پروتئین، نمونه‌های پروتئین (۷۵ میکروگرم) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) تحت الکتروفورز قرار گرفتند. بعد از اتمام الکتروفورز، نمونه‌ها از ژل به غشای PVDF منتقل شدند. بعد از تمام شدن فرایند انتقال، به‌منظور مسدود کردن جایگاه‌های غیراختصاصی، غشای حاوی پروتئین‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق در بافر مسدودکننده skim milk ۵ درصد قرار داده شد. غشای PVDF پس از پایان مرحله بلاکینگ، سه بار با بافر TBST1X در هر بار ۱۰ دقیقه شستشو داده شد تا برای اتصال آنتی‌بادی موردنظر آماده شود. پس از مرحله شستشو، غشا درون محلول آنتی‌بادی اولیه آنتی‌بادی ضد P53 اولیه (با رقت ۱ به ۵۰۰۰) و ضد بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی (با رقت ۱ به ۵۰۰۰) به‌صورت شبانه در دمای ۴ درجه همراه با شیک آهسته انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، غشا سه بار با TBST (هر بار۱۵ دقیقه) شستشو داده شد و سپس به مدت یک ساعت با محلول آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با آنزیمHRP در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بعد از شستشوی مجدد غشا با TBST (۳ بار و هر بار ۱۵ دقیقه)، غشا به مدت ۲ دقیقه در مجاورت محلول‌های کیت ECL (به نسبت ۱ به ۱) قرار گرفت و سپس با قرار دادن آن درون دستگاه کمی‌داک (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)، باندهای پروتئینی موردنظر ظاهر شدند به منظور کمی سازی باندهای پروتئینی از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

تحلیل آماری

به‌منظور دقت و صحت بیشتر، تمام آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (Chicago, IL, USA) و برای رسم نمودار از نرم‌افزار پریسم (graphpad prism 9) استفاده شد. برای مقایسه آماری میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. مقادیر به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (S.E.M) بیان شدند. در تمامی مقایسه‌ها مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌داری در نظر گرفته شد.

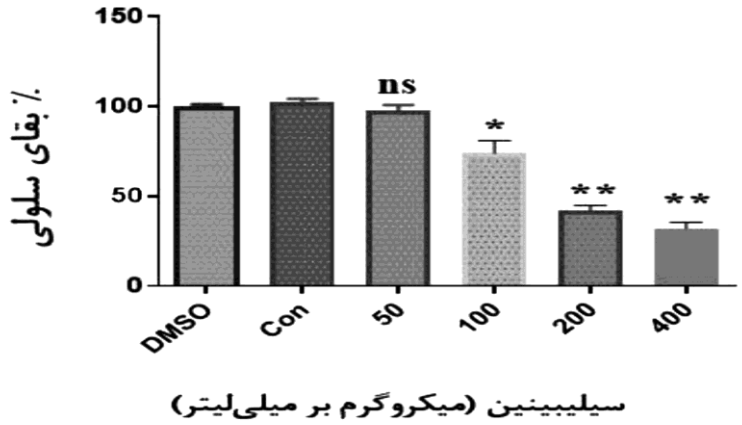


نمودار ۱. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی ۵-فلورواوراسیل بر روی بقای سلولی سلول‌های HT29. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از ۵-فلورواوراسیل به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده‌شده اند. مقایسه میانگین متغیرها بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (ns: عدم معنی‌داری و p < * 0.001)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

نتایج

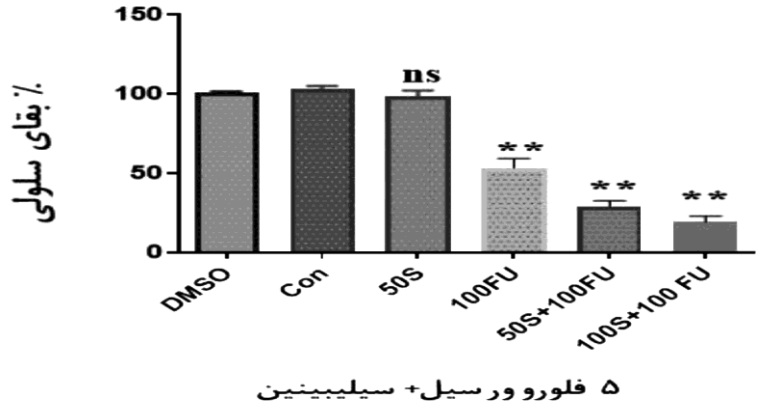
همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده‌شده است 5-FU بر بقای سلول‌های سرطانی HT29 اثر مهاری دارد. این اثر مهاری در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار 5-FU در ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. هر چه غلظت 5-FU استفاده‌شده بیشتر شد، میزان بقای سلولی کاهش بیشتر نشان داد که این خود نشان‌دهنده اثرات وابسته به دوز 5-FU بر میزان بقای سلولی رده سلولی HT29 است.



نمودار ۲. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی سیلیبینین بر روی بقای سلولی سلول‌های HT29. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از سیلیبینین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده‌شده اند. مقایسه میانگین متغیرها بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (ns: عدم معنی‌داری، $p < 0.01$ *، $p < 0.001$ **)

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده‌شده است سیلیبینین بر بقای سلول‌های سرطانی HT29 اثر مهاری دارد. این اثر مهاری در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین در ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. هر چه غلظت سیلیبینین استفاده‌شده بیشتر شد، میزان بقای سلولی کاهش بیشتر نشان داد که این خود نشان‌دهنده اثرات وابسته به دوز سیلیبینین بر میزان بقای سلولی رده سلولی HT29 می‌باشد. در این مرحله از آزمایش به بررسی اثرات سیلیبینین در تقویت اثرات دوزهای پایین 5-FU در از بین بردن سلول‌های HT29 پرداخته شد. به همین منظور سلول‌های HT29 به‌صورت هم‌زمان با سیلیبینین و 5-FU به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و میزان بقای سلول‌ها با تست MTT ارزیابی شد.

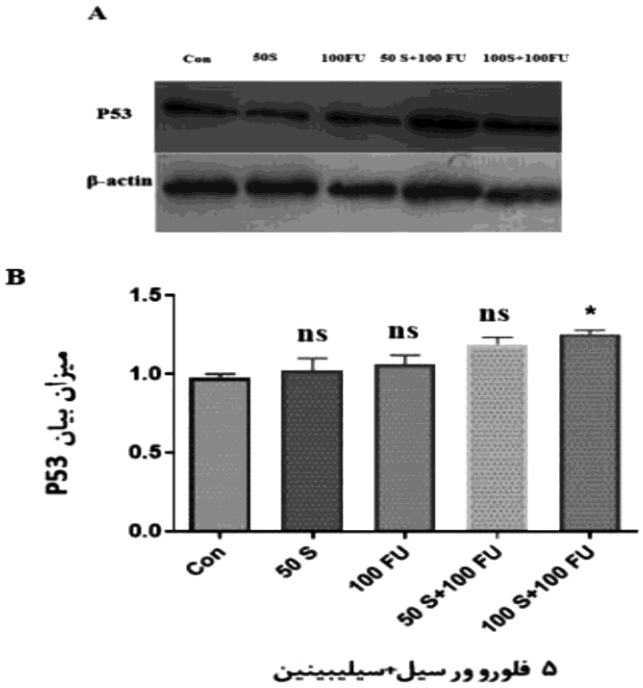
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]



نمودار ۳. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی تیمار هم زمان ۵-فلورواوراسیل با سیلیبینین بر روی بقای سلولی سلول‌های HT29. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از ۵-فلورواوراسیل و سیلیبینین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده‌شده اند. مقایسه میانگین متغیرها بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (ns: عدم معنی‌داری و $p < 0.001$ **)

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بقا سلول‌های HT29 در گروه تیمار شده به‌صورت هم‌زمان با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین با غلظت ۲۵ میکرومولار 5-FU نسبت به گروه کنترل از نظر آماری کاهش معنی‌داری داشت. این در حالی است که بقای این رده سلولی در تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار5-FU و ۵۰ میکروگرم بر میلی-لیتر سیلیبینین به تنهایی نسبت به گروه کنترل از نظر آماری کاهش معنی‌داری نشان نداد. همین‌طور سیلیبینین در غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث تقویت در اثرات کشندگی سلولی ۲۵ و ۵۰ میکرولار 5-FU گردید. سلول‌های HT29 در مدت زمان ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین و ۱۰۰ میکرومولار 5-FU به‌تنهایی و به‌طور هم‌زمان با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار5-FU تیمار شدند. پس از اتمام زمان تیمار، پروتئین این سلول‌ها استخراج گردید و میزان بیان پروتئین P53 با روش وسترن بلاتینگ انجام شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]



نمودار ۴. اثر در شرایط آزمایشگاهی تیمار هم زمان ۵-فلورواوراسیل با سیلیبینین بر روی میزان بیان پروتئین P53 در سلول‌های HT29. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از ۵-فلورواوراسیل و سیلیبینین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بیان پروتئین P53 روش وسترن بلاتینگ تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده‌شده اند. مقایسه میانگین متغیرها بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (ns: عدم معنی‌داری و $p < 0.05$ *)

نتایج نشان داد که 5-FU در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اثر آماری معنی‌داری بر روی میزان بیان پروتئین P53 ندارد؛ اما وقتی‌که سلول‌ها به‌طور هم‌زمان با غلظت ۱۰۰ میکرومولار 5-FU و ۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین تحت تیمار قرار گرفتند، باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان پروتئین P53 نسبت به گروه کنترل شدند.

بحث

سرطان کولورکتال یکی از علل عمده مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در کشورهای توسعه یافته و درحال‌توسعه برای مردان و زنان است. علیرغم پیشرفت‌هایی که سالیان اخیر در مورد درمان سرطان کولورکتال صورت گرفته است، همچنان نیاز بیشتری به اقدامات درمانی و پیشگیرانه مؤثرتر و کم سمی‌تر وجود دارد (۲۱ و ۱). استفاده از ترکیبات طبیعی به دلیل سمیت کم و دسترسی زیاد به‌طور سنتی توسط افراد برای درمان سرطان مورداستفاده قرار می‌گرفت؛ اما در مورد مکانیسم‌های مولکولی این اثرات اطلاع زیادی در دسترس نبود (۲۴-۲۲). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد مکانیسم اثر این ترکیبات در انواع مختلف سلول-های سرطانی صورت گرفته است. ترکیبات طبیعی از راه-های مختلفی مثل تنظیم تکثیر و القای توقف چرخه سلولی و همچنین القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی گردند(۲۶-۲۵-۲۲)در حال حاضر درمان‌های مختلفی برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال وجود دارد که علیرغم اثرات مفید این داروها، عوارض جانبی متعددی هم از این داروها گزارش‌شده است که باعث کاهش کیفیت زندگی بیماران می‌شود (۲۷). ازاین‌رو، توسعه یک روش درمانی جدید با عوارض جانبی کمتر از اهمیت حیاتی برخوردار است. رایج‌ترین شیمی‌درمانی مورد استفاده برای سرطان کولورکتال 5-FU است؛ اما متأسفانه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

عود پس از درمان با5-FU رایج است. در سال‌های اخیر راهکارهای درمانی مبتنی بر ترکیب داروهای شیمی‌درمانی با ترکیبات طبیعی با هدف بالا بردن راندمان درمان و کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی، بسیار مورد توجه قرارگرفته است (۲۸). علیرغم مطالعات متعدد صورت گرفته بر روی اثرات ضد سرطانی سیلیبینین بر روی مرگ سلولی و آپپتوز (۳۲-۲۹)، مطالعه‌ای در زمینه استفاده هم‌زمانی سیلیبینین و 5-FU در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال صورت نگرفته است؛ بنابراین ما در مطالعه حاضر اثر داروهای مذکور به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر میزان بقای سلول و سطح بیان پروتئین P53 را در رده سلولی HT29 مورد بررسی و آزمایش قراردادیم.

سلول‌ها با افزایش غلظت 5-FU و سیلیبینین تیمار شدند و ترکیب و اثر سیتوتوکسیک آن‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. نتایج نشان داد که 5-FU و سیلیبینین به‌صورت وابسته به دوز باعث ایجاد سمیت سلولی در رده سلولی HT29 می‌شوند و تیمار هم‌زمان سلول‌ها با 5-FU و سیلیبینین اثر سیتوتوکسیک قوی‌تری نسبت به درمان انفرادی با هر دارو نشان داد؛ بنابراین، نتایج ما نشان داد که تیمار هم‌زمان 5-FU و سیلیبینین سمیت قابل‌توجه بالاتری را در مقایسه با درمان انفرادی آن‌ها در رده سلولی سرطان کولون HT-29 ایجاد کردند. مطالعات متعددی در تائید نتایج ما صورت گرفته که نشان داده‌اند سیلیبینین می‌تواند باعث از بین بردن و مرگ سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان کولورکتال گردد (۳۴-۳۲).

نتایج وسترن بلات ما نشان داد که تیمار هم‌زمانی داروهای 5-FU و سیلیبینین سلول‌های HT29 تأثیر مشهودتری نسبت به تیمار تنهای داروهای مذکور در افزایش سطح بیان پروتئین P53 می‌گذارد. ژن P53 در حالت عادی پروتئین P53 را تولید می‌کند که این پروتئین در حالت طبیعی، به سلول دارای DNA آسیب دیده فرمان توقف تکثیر را صادر کرده تا آسیب وارد شده به DNA اصلاح گردد و اگر سلولی قادر به اصلاح آسیب نباشد فرمان آپپتوز برای آن سلول صادر می‌گردد. از طرفی اگر جهش در ژن P53 رخ دهد و عملکرد پروتئین حاصل از آن دچار اختلال گردد، سلول با DNA آسیب دیده به تکثیر خود ادامه داده و سلول‌های غیرطبیعی بیشتری توسط آن سلول تولید می‌شود. به دلیل داشتن چنین نقش‌هایی به P53، لقب نگهبان ژنوم داده‌اند که با اعمال اثرات خود در مرحله G1-S از چرخه سلولی، از سلول در برابر آسیب حمایت می‌کند. با توجه به مطالب فوق نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین P53می‌تواند اثرات ضد تکثیری خود را از طریق مهار چرخه سلول، آپوپتوز و پیری سلول در پاسخ به محرک‌های مختلف داخل سلولی و خارج سلولی مانند آسیب به DNA بر اثر استفاده از پرتوهای یونیزاسیون اشعه UV و استفاده از داروهای شیمی‌درمانی، ویروس‌های عفونی، شوک حرارتی و هیپوکسی اعمال کند (۲۰-۱۷). با توجه به نتایج مطالعه ما و با توجه به اینکه در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌های کولورکتال جهش‌هایی در ژن P53 مشاهده‌شده است (۳۵)، ممکن است سیلیبیلین از طریق افزایش دادن بیان پروتئین P53 اثرات ضد توموری خود را در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال اعمال کند. اثر سیلیبیلین در افزایش بیان پروتئین P53 در مطالعات محققین دیگر در نمونه‌های مختلف سرطانی گزارش‌شده است که تائید کننده نتایج مطالعه ما است(۳۶). اثر تیمار هم‌زمان سیلیبینین و 5-FU در رده‌های دیگر سلول سرطانی هم گزارش شده است. در تایید با نتایج مطالعه ما، مطالعه Shanaya Pate و همکاران نشان داد که در رده سلولی سرطان کولون HCT116 اثر تیمار هم‌زمان سیلیبینین با 5-FU دارای اثر سنرژیسم در مرگ سلول‌ها می‌باشند. این اثر سینرژیسم همچنین باعث مهار مهاجرت سلول‌ها، فعال کردن مسیر داخلی آپپتوز و مرگ سلول‌ها از طریق اتوفاژی می‌گردد (۳۷). همچنین نتایج مطالعه Mohammad Jaber MasodKhooy و همکاران نشان داد که در رده سلولی H22 سرطان هپاتوسلولار داروهای 5-FU و اسانس خار مریم باعث مرگ سلول‌های این رده سلولی می‌شوند. اثر تیمار هم‌زمان دو ترکیب فوق باعث کاهش مهاجرت سلولی و تهاجم سلولی می‌شود. همچنین این افراد نشان

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

دادند که ترکیب دو داروی فوق باعث تغییر در بیان ژن‌های دخیل در آپپتوز می‌گردد. هم‌چنین ترکیب دو داروی فوق باعث کاهش بیان ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ Wnt می‌گردد (۳۸). نتایج این مطالعات نشان دادند که اثر تیمار هم‌زمان دارویی 5-FU و سیلیبینین نسبت به تیمار تنهای دو دارو اثرات بیشتری بر مرگ سلولی دارد که نتایج مطالعه ما هم در تائید این نتایج نشان داد که در رده سلولی HT29 سرطان کولورکتال هم تیمار هم‌زمان دو داروی فوق اثرات بیشتری بر مرگ سلولی نسبت به تیمار تنهای دو داروی فوق دارند. پروتئین P53 در حالت نرمال و شرایط عادی باعث توقف چرخه سلولی می شود تا امکان ترمیم DNA و یا آپوپتوز را فراهم کند تا از تکثیر سلول هایی که آسیب جدی به DNA آن‌ها وارد شده است جلوگیری کند. یکی از ژن‌های کلیدی و مهمی که هدف پروتئین P53 قرار می‌گیرد، پروتئین پیش‌برنده آپپتوز Bax است که باعث القای آپوپتوز سلول سرطانی می‌گردد؛ بنابراین بر اساس نتایج مطالعه ما می‌توان گفت که سیلیبینین از طریق افزایش دادن میزان بیان P53 و احتمالاً تأثیر بر روی میزان بیان Bax باعث تقویت اثرات سیتوتوکسیک 5-FU از طریق القای آپپتوز و یا توقف چرخه سلولی می‌گردد و از این طریق باعث مرگ سلولی سلول‌های HT29 سرطان کولورکتال گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب داروهای 5-FU و سیلیبینین در مقایسه با تیمار تنهای این داروها می‌تواند اثرات بیشتری بر روی بقای سلولی سلول‌های HT29 سرطان کولورکتال بگذارد. این اثرات در ارتباط با افزایش سطح پروتئین P53 در رده سلولی فوق می‌باشند. این نتایج مزیت احتمالی ترکیب داروهای 5-FU و سیلیبینین را برای مداخله در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال تائید می‌کند هرچند که برای نتیجه‌گیری کلی در این مورد نیاز به مطالعه بیشتر و جامع‌تری است.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی (با شماره طرح TRC-9903) و با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، ایران انجام شد. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. Jama. 2021;325(7):669-85.
2. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. Transl Oncol. 2021;14(10):101174.
3. Alizadeh-Navaei R. The Effect of Statins in Combination with Chemotherapy on Colon Cancer Cell Lines. JBUMS. 2022;24(1):50-5.
4. Moutabian H, Majdaeen M, Ghahramani-Asl R, Yadollahi M, Gharepapagh E, Ataei G, et al. A systematic review of the therapeutic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil during colorectal cancer treatment: With a special focus on the oxidant, apoptotic, and anti-inflammatory activities. Cancer Cell Int. 2022;22(1):1-14.
5. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. P&T. 2020;206:107447 .6.Moracci L, Sensi F, Biccari A, Crotti S, Gaio E, Benetti F, et al. An investigation on [5 fluorouracil and epigallocatechin-3-gallate] complex activity on HT-29 cell death and its stability in gastrointestinal fluid. Oncotarget. 2022;13:476.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

7. Sanaei A, Mohammadzadeh G, Rashidi M. Quercetin Improves the Anti-angiogenic Property of 5-Fluorouracil on the Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC Cell Line. Int. J. Cancer Manag.2022;15.4.
8.Aiello P, Sharghi M, Mansourkhani SM, Ardekan AP, Jouybari L, Daraei N, et al. Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. Oxidative Med. Cell. 2019;2019.
9. Fernández J, Silván B, Entrialgo-Cadierno R, Villar CJ, Capasso R, Uranga JA, et al. Antiproliferative and palliative activity of flavonoids in colorectal cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;143:112241.
10.Motafeghi F, Shokrzadeh M, Mohammadi H, Shokrzadeh S, Razaghi H. Evaluation of Antibacterial Properties and Cytotoxicity of Ethanolic Extract of Alhagi Maurorum. JBUMS. 2023;25(1):340-7.
11. Wu Z, Tan B, Liu Y, Dunn J, Martorell Guerola P, Tortajada M, et al. Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and scotch spearmint. Molecules. 2019;24(15):2825.
12. Rodríguez LGR, Gasga VMZ, Pescuma M, Van Nieuwenhove C, Mozzi F, Burgos JAS. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. Int. Food Res. 2021;140:109854.
13. El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G. Wasef L, Elewa YH, A. Al-Sagan A, Abd El-Hack ME, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (Allium sativum L.) :A review. Nutrients. 2020;12(3):872.
14. Boojar MMA, Boojar MMA, Golmohammad S. Overview of Silibinin anti-tumor effects. J. Herb. Med. 2020;23:100375.
15. Firouzi J, Sotoodehnejadnematalahi F, Shokouhifar A, Rahimi M, Sodeifi N, Sahranavardfar P, et al. Silibinin exhibits anti-tumor effects in a breast cancer stem cell model by targeting stemness and induction of differentiation and apoptosis. BioImpacts: BI. 2022;12(5):415.
16. Nagy Á, Munkácsy G, Győrffy B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. Sci. Rep. 2021;11(1):6047.
17.Gupta A, Shah K, Oza MJ, Behl T. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: a novel therapy for cancer treatment. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019;109:484-92.
18. Sadia H, Bhinder MA, Irshad A, Zahid B, Ahmed R, Ashiq S, et al. Determination of expression profile of p53 gene in different grades of breast cancer tissues by real time PCR. Afr. Health Sci. 2020;20(3):1273-82.
19. Liebl MC, Hofmann TG. The role of p53 signaling in colorectal cancer. Cancers. 2021;13(9):2125.
20. Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, et al. Targeting the oncogenic p53 mutants in colorectal cancer and other solid tumors. Int. J. Mol. Sci. 2019;20(23):5999.
21. Krasteva N, Georgieva M. Promising therapeutic strategies for colorectal cancer treatment based on nanomaterials. Pharmaceutics. 2022;14(6):1213.
22. Shafabakhsh R, Asemi Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. J. Ovarian Res. 2019;12:1-9.
23. Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 2020;13(3):265-85.
24. Moradipoodeh B. Amygdalin may potentiate the effects of lapatinib on SK-BR-3 cancer cell death through increasing Bax expression. SJKU 2023, 28(3): 1-12.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]

25.Tewari D, Patni P, Bishayee A, Sah AN, Bishayee A, editors. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. Semin Cancer Biol . 2022:80:1-17
26. Ismail NI, Othman I, Abas F, H. Lajis N, Naidu R. Mechanism of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. Int. J. Mol. Sci. 2019;20(10):2454.
27. Xie Y-H, Chen Y-X, Fang J-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):22.
28.Shin MH, Kim J, Lim SA, Kim J, Lee K-M. Current insights into combination therapies with MAPK inhibitors and immune checkpoint blockade. Int. J. Mol. Sci. 2020;21(7):2531.
29. Si L, Liu W, Hayashi T, Ji Y, Fu J, Nie Y, et al. Silibinin-induced apoptosis of breast cancer cells involves mitochondrial impairment. Arch. Biochem. 2019;671:42-51.
30 Iyengar RM ,Devaraj E. Silibinin triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in human Oral squamous carcinoma cells. APJCP. 2020;21(7):1877.
31. Sameri S, Saidijam M, Bahreini F, Najafi R. Cancer chemopreventive activities of silibinin on colorectal cancer through regulation of E-cadherin/β-catenin pathway. Nutr Cancer. 2021;73(8):1389-99.
32. Jackson K, Devaraj E, Lakshmi T, Rajeshkumar S, Dua K, Chellappan DK, et al. Cytotoxic potentials of silibinin assisted silver nanoparticles on human colorectal HT-29 cancer cells. Bioinformation. 2020;16(11):817.
33. Zare Z, Lohrasbi A, Sheikhalishahi ZS, Asadi A, Zakeri M, Hosseinabadi F, et al. Silibinin inhibits TGF-β-induced MMP-2 and MMP-9 through Smad Signaling pathway in colorectal cancer HT-29 cells. Clin. Cancer Res. 2020.
34. Fallah M, Davoodvandi A, Nikmanzar S, Aghili S, Mirazimi SMA, Aschner M, et al. Silymarin (milk thistle extract) as a therapeutic agent in gastrointestinal cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;142:112024.
35. Michel M, Kaps L, Maderer A, Galle PR, Moehler M. The role of p53 dysfunction in colorectal cancer and its implication for therapy. Cancers. 2021;13(10):2296.
36. Koushki M, Khedri A, Aberomand M, Baghbani KA ,Mohammadzadeh G. Synergistic anti-cancer effects of silibinin-etoposide combination against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. Iran. J. Basic Med. Sci. 2021;24(9):1211.
37. Patel S, Waghela B, Shah K, Vaidya F, Mirza S, Patel S, et al. Silibinin, A natural blend in polytherapy formulation for targeting Cd44v6 expressing colon cancer stem cells. Sci. Rep. 2018;8(1):16985.
38. Gupta J, Abdulsahib WK, Jalil AT, Kareem DS, Aminov Z, Alsaikhan F, et al. Prostate cancer and microRNAs: New insights into apoptosis. Pathol Res Pract. 2023;245:154436

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-04-04]