بررسی اثر سیلیبین بر بیان گیرنده HER2 در رده سلولی SKBR3 سرطان سینه

نرگس محمودی (M.Sc)[۱و۲]- *دکتر نسرین معتمد (Ph.D)[۱و۲]- دکتر سید حسن پای‌لاخی (Ph.D)[۳]

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی،گروه سلولی و مولکولی

Email: Motamed2@khayam.ut.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله:۹۰/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۱

چکیده

مقدمه: HER2 (ERBB2 یا EGFR2) از آنکوژن‌های معروف در سرطان سینه است که در حدود ۳۰٪ از سرطان‌های سینه بیان آن افزایش می‌یابد. در مطالعات متعدد آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنول طبیعی، به علت کارایی بالا و تاثیر جانبی کم یکی از موثرترین ترکیب‌های مهارکننده سرطان شناسایی شده‌اند. سیلیبین ماده موثره گیاه خار مریم یک پلی فنول فلاونولیگنان است که در سال‌های اخیر به دلیل دو خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

هدف: بررسی تاثیر سیلیبین بر گیرنده HER2 در رده سلولی SKBR3 سرطان سینه

مواد و روش‌ها: ابتدا رده سلولی SKBR3 کشت داده شد و سپس از آزمایشMTT برای تعیین میزان سمیت سیلیبین و از روش RT-Real Time PCR در بررسی میزان بیان ژن در حضور و بدون حضور سیلیبین استفاده شد.

نتایج: با آزمایش MTT میزان سیتوتوکسیسته سیلیبین در دوزهای ۵۰ تا ۳۵۰ میکرومولار طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده SKBR3 بدست آمد و مشخص شد که سیلیبین به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان دارای اثر بازدارندگی بر این رده سلولی است. میزان IC50 سیلیبین طی ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب۲۷۴/۴۷ و ۲۰۳/۳۸ میکرومولار و با Real Time RT-PCR کاهش بیان HER2 طی۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دو دوز ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: می‌توان از سیلیبین در سرطان‌های سینه HER2 مثبت جهت کاهش بیان این ژن استفاده کرد که در مقایسه با داروهای ضد سرطان HER2 مثبت دارای تاثیر جانبی کمتر و عمومی‌بودن بیشتر در سرطان‌هاست.

کلید واژه‌ها: سرطان‌های پستان/ سیلی مارین/ ژن‌های ای اچ آر ۲

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست‌ویکم شماره ۸٤، صفحات: ۴۱-۳۴

مقدمه

بعد از سرطان پوست شایع‌ترین سرطان در زنان، سرطان سینه است که حدود ۱۶٪ از سرطان‌های زنان را شامل می‌شود(۱). یکی از آنکوژن‌های شناخته شده در سرطان سینه *(EGFR2* یا *HER2 (ERBB2* (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی۲) است که در حدود ۳۰٪ از سرطان‌های سینه بیان آن افزایش می‌یابد(۳-۲).

آثار ضدسرطانی و توان بازدارندگی ترکیب‌های متعددی در درمان سرطان سینه بررسی شده‌است. تراستوزوماب (Trastuzumab) یا همان هرسِپتین (Herceptin) در درمان سرطان سینه متاستازی HER2 مثبت کاربرد دارد که البته تاثیر جانبی آن بر قلب چشم گیر و شامل، کاهش عملکرد قلب، ضربان نامرتب، فشار خون بالا، حمله قلبی و در برخی موارد مرگ است(۵-۴). از طرفی با این‌که آنتی بادی‌های منوکلونال و مهارکننده‌های کینازی از پیام‌های ErbB و در نهایت به طور موثری از پیشرفت تومورهای سینه جلوگیری می‌کنند، اثر آنها تنها زیر مجموعه خاصی از بیماران را شامل می‌شود(۶). بنابراین، در برخی موارد باید به دنبال ترکیب‌هایی بود که معمول‌تر بوده و اثر جانبی کمتری داشته باشند.

در این میان آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنول طبیعی، به علت کارایی بالا و تاثیر جانبی کم یکی از موثرترین ترکیب‌های مهارکننده سرطان شناسایی شده‌اند(۱۰-۷). سیلیمارین یکی از این ترکیب‌ها است که جزء فعال گیاه خار مریم و شامل فلاولیگنان‌های زیاد از جمله سیلیبین، ایزوسیلیبین، دهیدروسیلیبین، سیلیدیانین، سیلیکریستین و غیره است(۱۲-۱۱). سیلیبین ماده موثره این گیاه(۱۳) و یک پلی‌فنول فلاونولیگنان است که از سیلیمارین جداسازی شده و دارای دو خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و ضدسرطانی است(۱۴). بررسی‌ها اثر مهاری تکثیر سلولی سیلیبین را در سرطان‌های مختلف از جمله پوست، کولون، ریه، پروستات و سینه نشان داده‌است(۱۵). نیز در بررســـی‌های اخیر سیلیبین باعث مهار

۱. کیش، دانشگاه تهران، پردیس بین‌المللی کیش، گروه سلولی مولکولی ۲. تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه سلولی مولکولی

۳. دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی

www.SID.ir

تکثیـــر سلـــولی در رده MDA-MB-231 سرطان سینه(۱۶) و3- PC سرطان پروستات (۱۷) شده‌است.

هدف این مطالعه بررسی میزان بیان ژن گیرنده HER2 توسط سیلیبین در رده سلولی SKBR3 سرطان سینه است. این رده نمونه بارزی از یک رده سلولی HER2 مثبت در سرطان سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

SKBR3 یک رده سلولی آدنوکارسینومای سرطان سینه است که گیرنده HER2 را بیش از اندازه بیان می‌کند. برای کشت سلول ابتدا رده سلولی SKBR3 از بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور تهیه شد. برای ساخت محیط کشت از محیط کشت $RPMI_{1640}$ و سرم جنین گاوی (شرکتGibco)، Penicillin/Streptomycin (شرکت PAA)، بی‌کربنات سدیم و HEPES (شرکت Sigma)، آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده، فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر و سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری استفاده شد. برای برداشت و پاساژ سلول از Trypsin /EDTA (شرکت Sigma-Aldrich)،PBS 1X استریل(شرکت PAA)، فلاسک T-25 و فالکون۱۵ میلی‌لیتری(شرکت NEST) و برای انجام آزمایش رنگ‌سنجی MTT از پودر MTT، DMSO و سیلیبین (شرکت Sigma) و تریپان بلو (شرکت Merck)، PBS 1Xاستریل (شرکت PAA)، لام نئوبار(شرکت Brand)، پلیت ۹۶ خانه (شرکت SPL) استفاده شد و نتایج رنگ‌سنجی با دستگاه الایزا ریدر Gen5، مدل power wave xs2 ساخت شرکت BioTek در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. برای این آزمایش ابتدا سلول‌ها جهت بررسی در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۳ پلیت ۹۶ خانه کاشته شدند به طوری که در هر خانه حدود ۷۰۰۰ سلول (از طریق شمارش سلول با لام نئوبار) کاشته شد و حجم نهایی محیط کشت هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت (روز دوم) سلول‌ها با دوزهای ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و۳۰۰ میکرومولار سیلیبین تیمار شدند (تیمار سلول‌ها با سیلیبین در هر ۲۴ ساعت تکرار شد). در روز سوم محیط کشت درون خانه‌های پلیت ۲۴ ساعته خالی و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با رقت ۰/۵ mg/ml اضافه و به مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با پنج درصد CO_2 قرار داده شد و پس از آن هر یک از خانه‌ها خالی و به آن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد تا نمک بنفش رنگ فرمازان حاصل از واکنش احیاء به طور کامل حل شده تا بتواند براحتی در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر خوانده شود. تمام مراحل فوق برای پلیت‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز انجام شد

برای استخراج RNA از سلول‌ها از پلیت شش خانه (SPL)، RNX Plus (شرکت سیناژن) برای لیزکردن سلول‌ها و از کلروفرم، ایزوپروپانول (شرکت Chem Lab) و اتانول ۷۵٪ سرد، ویال‌های یک و نیم DNase و RNase free (شرکت Orange) اتوکلاو شده برای تهیه رسوب RNA استفاده شد. برای این کار ابتدا سه پلیت شش خانه نیاز است به طوری که در هر شش خانه حدود ۲۰۰۰۰۰ سلول به حجم نهایی دو میلی‌لیتر محیط کشت کاشته شده و پس از ۲۴ساعت با دوزهای ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار سیلیبین تیمار داده می‌شود. در روز بعد، از پلیت ۲۴ ساعته طبق روش زیر RNA استخراج شد: ابتدا محیط کشت هر خانه را خالی و با PBS شستشو داده، سپس به هر خانه حدود ۸۰۰ میکرولیتر RNX Plus اضافه و پس از ۳-۲ دقیقه چند بار پیپتاژ شد تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. سپس به ویال یک و نیم میلی لیتری انتقال داده و به هر ویال حدود ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد اضافه شده، و ۱۵ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. بعد از سانتریفوژ در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سه فاز تشکیل می شود. فاز رویی را با دقت برداشته و به ویال جدیدی انتقال داده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط کرده و در ۲۰- سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. بعداز ۲۰دقیقه (یا ۲۴ ساعت) در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌شود. سپس، محلول رویی را خالی و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ اضافه و در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه در دور ۹۰۰۰ سانتریفوژ می‌شود. بعداز خارج‌کردن کامل اتانول(تمام اتانول باید خشک شود) به هر ویال حدود ۳۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داد که بعد از تعیین

Archive of SID

www.SID.ir

میزان جذب و غلظت RNA اقدام به سنتز cDNA می‌شود. برای سنتز cDNA از dNTP (Cat#DN7604C CinnaGen)، Random Hexamer Primer (Cat#S0142 Fermentas)، Reverse Transcriptase 10000u (Cat#EP0441 Fermentas)، RiboLock RNase Inhibitor 2500u (Cat#E00381 Fermentas) (شرکت Fermentas)، DEPC Water (Cat#MR8244C CinnaGen) استفاده می‌شود. در سنتز cDNA به ازای هر واکنش، یک میکرولیتر Random Hexamer Primer (۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه)، یک میکرولیتر dNTP، Reverse Transcriptase و RiboLock RNase Inhibitor، چهار میکرولیتر Reverse Transcriptase Buffer (5 X) و دو میکرولیتر آب DEPC اضافه می‌شود(پنج دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد).

برای بررسی بیان ژن‌ها از روش Real Time PCR استفاده شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ و ۲ آورده شده‌است. برای هر واکنش، یک میکرولیتر پرایمر، پنج میکرولیتر از کیت سایبرگرین QuantiFast SYBR Green PCR Kit (400) Q204054 (شرکت Qiagen)، یک میکرولیتر cDNA و سه میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد.

جدول ۱: مشخصات پرایمر ERBB2 شرکت Qiagen، Hs_ERBB2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT00060746)

اختصار	ERBB2
نام رسمی	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/ glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
گونه	انسان(Homo sapiens)
رونوشت قابل‌شناسایی	NM_001005862
طول رونوشت قابل‌شناسایی	٤٨١٦ bp
اگزون تکثیر شده	۷/۸
طول تکثیر شده	۹۰ bp
نشان‌دار رنگی/شناسایی	سایبر گرینI
نوع آزمایش	پرایمر QuantiTect
سایر رونوشت‌های قابل‌شناسایی	NM_004448

جدول ۲: مشخصات پرایمر GAPDH شرکت Qiagen، Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT01192646)

اختصار	GAPDH
نام رسمی	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
گونه	انسان(Homo sapiens)
رونوشت قابل شناسایی	NM_002046
طول رونوشت قابل شناسایی	۱۳۱۰ bp
اگزون تکثیر شده	۱/۲/۳
طول تکثیر شده	۱۱۹ bp
نشان‌دار رنگی/ شناسایی	سایبر گرینI
نوع آزمایش	پرایمر QuantiTect
سایررونوشت‌های قابل شناسایی	-

نتایج

با آزمایش MTT درصد بقاء طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و IC_{50} سیلیبین با نرم‌افزار Pharm PCS (Pharmacologic Calculation System) statistical package (Springer Verlag, USA) طی ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی SKBR3 برای تعیین میزان سمیت سیلیبین تعیین شد که اعداد به ترتیب در جدول ۳ و ۴ گزارش شده اند و نمودار درصد بقاء (شکل

Archive of SID

www.SID.ir

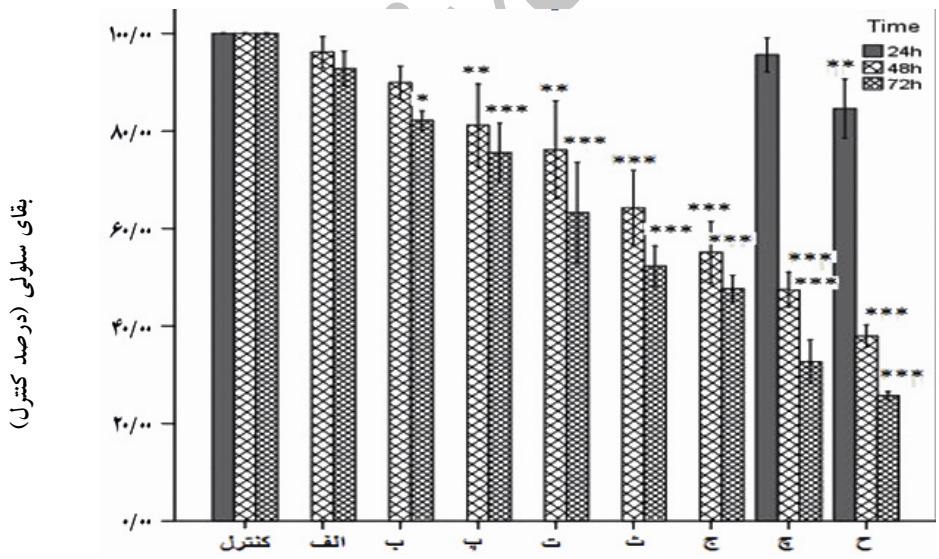
۱) با نرم‌افزار SPSS 18 به روش Clustered Bar, Summaries for group of case رسم شد (Error bars: +/- 1 SD). محاسبه P value با استفاده از SPSS 18 و با آزمایش مقایسه‌ای One-Way ANOVA (Dunnett-t Post Hoc, 2-sided) انجام شد و معنی‌دار بودن نتایج، در نمودارها به صورت ستاره مشخص شده‌است (P < ۰/۰۰۱ : *** , P<۰/۰۱ : ** , P < ۰/۰۵ : *)

جدول ۳: درصد بقاء سلول‌های SKBR3 تیمار شده پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون

غلظت‌های نمونه	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل (غلظت صفر)	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
۵۰ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۹۶/۲۰	٪۹۲/۸۲
۷۵ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۸۹/۹۰	٪۸۲/۱۸
۱۰۰ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۸۱/۱۷	٪۷۵/۵۶
۱۵۰ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۷۶/۱۵	٪۶۳/۲۷
۲۰۰ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۶۴/۲۳	٪۵۲/۲۷
۲۵۰ میکرومول بر لیتر	بی اثر	٪۵۵/۱۴	٪۴۷/۶۷
۳۰۰ میکرومول بر لیتر	٪۹۵/۶۰	٪۴۷/۱۴	٪۳۲/۷۰
۳۵۰ میکرومول بر لیتر	٪۸۴/۵۸	٪۳۷/۹۴	٪۲۵/۷۴

جدول ۴: IC50 سیلیبین بر رده سلولی SKBR3 در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت (بر حسب میکرومولار)

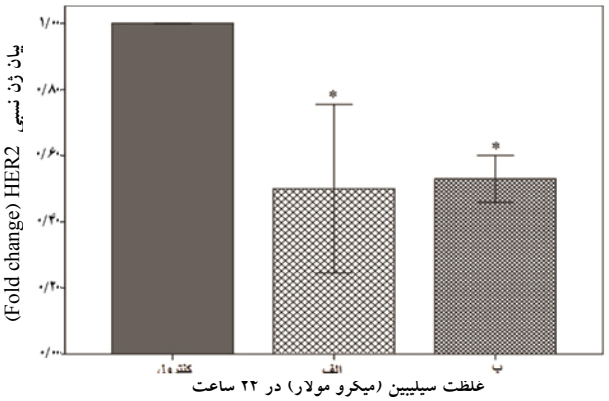
۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۲۷۴/۴۷	۲۰۳/۳۸



شکل۱: درصد بقاءسلول‌هایSKBR3 در اثر غلظت‌های مختلف سیلیبین در مقایسه با نمونه کنترل طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت(کنترل:۰، الف: ۵۰ µM ، ب: ۷۵ µM، پ: ۱۰۰ µM، ت: ۱۵۰ µM، ث: ۲۰۰ µM، ج: ۲۵۰ µM، چ: ۳۰۰ µM، ح: ۳۵۰ µM).هر یک از نقاط، نتایج حاصل از سه آزمون مستقل است. معنی‌داربودن نتایج، در نمودارها به صورت ستاره مشخص شده‌است.
(P < ۰/۰۰۱ : *** , P<۰/۰۱ : ** , P < ۰/۰۵ : *)

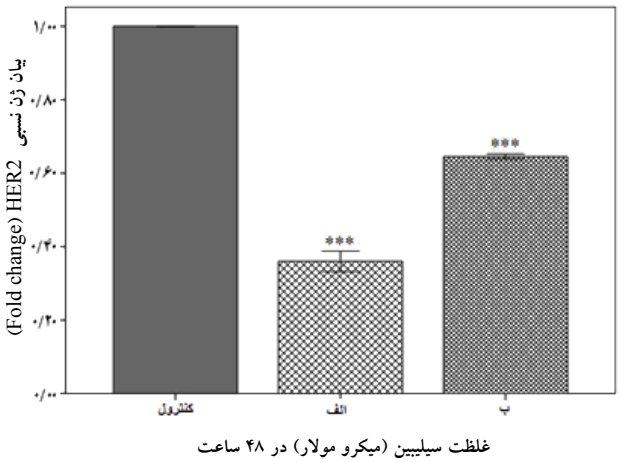
www.SID.ir

سلول‌ها با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار سیلیبین طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و از آن‌ها RNA استخراج شد و سپس سنتز cDNA انجام شد. میزان بیان ژن *HER2* با روش Real Time RT-PCR طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار ارزیابی گردید. میزان بیان این ژن با یک ژن مرجع (*GAPDH*) مقایسه شد. نتایج با کمیت سنجی نسبی به روش $\Delta\Delta C_T$ آنالیز و نمودار آنها با نرم افزار SPSS 18 به روش Simple Bar, Summaries for group of case رسم شد که در شکل ۲، ۳ و ۴ نمایش داده شده است (Error bars: +/- 1 SD). محاسبه P value با استفاده از SPSS 18 و آزمایش مقایسه‌ای One-Way ANOVA (Dunnett-t Post Hoc, 2-sided) انجام و معنی‌داربودن نتایج در نمودارها با ستاره مشخص شد (**P<۰/۰۱*** , P < ۰/۰۰۱ : ** , P < ۰/۰۵ : *). با توجه به روش $\Delta\Delta C_T$ یا روش C_T مقایسه‌ای (روش کمیت سنجی نسبی) که تغیر نسبی بیان ژن را بین ژن هدف و خانه‌دار تعیین می‌کند نتایج Real Time RT-PCR محاسبه شد(سطح بیان ژن هدف با ژن خانه‌دار، نرمال شده و وابسته به کنترل ارائه شد). پس‌از ۲۴ ساعت دو دوز ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار سیلیبین نسبت به کنترل (Fold change=1) باعث کاهش بیان ژن HER2 به ۰/۵ و ۰/۵۳ Fold change (میزان تغییر بیان) شدند(P<۰/۰۵). این میزان در ۴۸ ساعت به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۶۴(P<۰/۰۰۱) و در ۷۲ ساعت ۰/۷۵ و ۰/۵۶ Fold change بود(P<۰/۰۰۱).



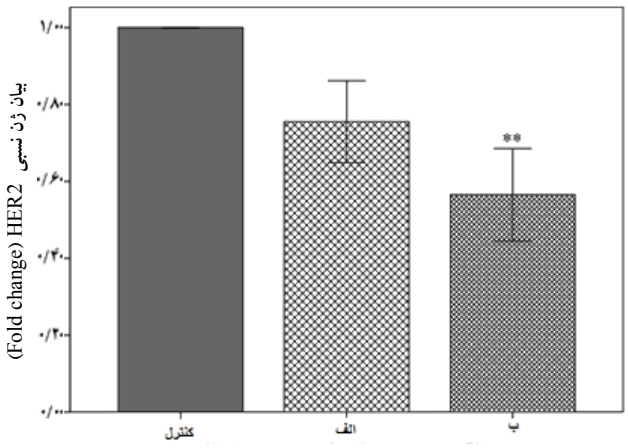
غلظت سیلیبین (میکرو مولار) در ۲۴ ساعت

شکل۲: میزان کاهش بیان ژن *HER2* طی ۲۴ساعت با دو دوزانتخابی سیلیبین در رده SKBR3 (کنترل:۰، الف: ۱۵۰ µM، ب: ۲۵۰ µM). هر یک از نقاط میانگین حاصل از دو آزمون مستقل است که در هر آزمون Real Time PCR به صورت دوتایی، با روش $\Delta\Delta C_T$ انجام گرفت(P<۰/۰۵).



غلظت سیلیبین (میکرو مولار) در ۴۸ ساعت

شکل۳: میزان کاهش بیان ژن *HER2* طی ۴۸ ساعت با سیلیبین در رده SKBR3 (کنترل:۰، الف: ۱۵۰ µM، ب: ۲۵۰ µM). هر یک از نقاط میانگین حاصل از دو آزمون مستقل است که در هر آزمون Real Time PCR به صورت دوتایی، با روش $\Delta\Delta C_T$ انجام گرفت(P<۰/۰۰۱).



غلظت سیلیبین (میکرو مولار) در ۷۲ ساعت

شکل۴: میزان کاهش بیان ژن *HER2* طی ۷۲ ساعت با سیلیبین در رده SKBR3 (کنترل: ، الف: ۱۵۰ µM ، ب: ۲۵۰ µM). هر یک از نقاط میانگین حاصل از دو آزمون مستقل است که در هر آزمون Real Time PCR به صورت دوتایی، با روش $\Delta\Delta C_T$ انجام گرفت (:P< ۰/۰۰۱).**

بحث و نتیجه‌گیری

مقایسه نتایج آزمون MTT بر سلول‌های سرطان سینه در مجاور غلظت‌های مختلف سیلیبین، نشان داد که سیلیبین به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان اثر بازدارندگی بر رده سلولی SKBR3 دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به نتایج MTT، سیلیبین در غلظت‌های نامبرده پس از ۴۸ ساعت بر این رده سلولی اثر مهارکنندگی بر تکثیر سلولی دارد ولی در ۲۴ ساعت اول تاثیر آن چندان نیست. به طوری که در بعضی غلظت‌ها در طی ۲۴ ساعت باعث تکثیر بیشتر سلول‌های رده SKBR3 شد. گرچه هدف نهایی این مطالعه یافتن میزان غلظت‌کشندگی نیست اما، دانستن غلظت‌های با میزان کشندگی بالا باعث شد آن دوزها جهت بررسی بیان ژن *HER2*، انتخاب نشود. بنابراین، با محاسبه درصد بقای سلولی، میزان IC50 سیلیبین در ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده SKBR3 تعیین شد تا ترجیحاً غلظت‌های پایین‌تر از IC50 با میزان کشندگی کمتر برای بررسی اثر بیان ژن گیرنده HER2 انتخاب شوند.

با بررسی نتایج، دو غلظت ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرومولار انتخاب شدند. نتایج Real Time RT-PCR حاکی از تاثیر بهتر کاهندگی دوز ۱۵۰ نسبت به ۲۵۰ میکرومولار سیلیبین در ۲۴ و ۴۸ ساعت است. گرچه، در ۲۴ ساعت کاهش بیان ژن *HER2* در دوز ۱۵۰ میکرومولار نوساناتی دارد که به نظر می‌رسد برای تثبیت و اثر بخشی بهتر این دوز بیش از ۲۴ ساعت تیمار سلولی ضرورت داشته‌باشد.

در ۷۲ ساعت، دوز ۲۵۰ بیش از ۱۵۰ میکرومولار باعث کاهش بیان ژن *HER2* شد. در کل در هر دو دوز و در تمام فاصله‌های زمانی شاهد کاهش بیان ژن نسبت به نمونه کنترل بودیم.

بررسی‌ها نشان داده که داروهای ضد سرطان جهت درمان سرطان‌ها همیشه کارایی لازم را ندارند. از اولین و معروف‌ترین داروهای ضدسرطان برای بیماران $HER2^+$، هرسپتین یا تراستوزوماب است. با توجه به این‌که سطح بیان گیرنده HER2 در سلول‌های سرطانی از سلول‌های طبیعی بسیار بیشتر است، لذا میزان حساسیت آنها به دارو کم بوده و این دارو تنها در بیماران $HER2^+$ تجویز می‌شود که حدود ۳۰-۲۵ درصد سرطان‌های سینه را شامل می‌شود. در برخی از بررسی‌ها نشان داده شد که بعد از مصرف این دارو هیچ تأثیری در کاهش بیان ژنHER2 صورت نگرفت و فقط باعث بلوک گیرنده‌های HER2 شده‌است(۱۸).

سیلیبین به همراه بعضی از داروهای ضد سرطان مانند سیس‌پلاتین (Cisplatin)، کاربوپلاتین (Carboplatin)، دوکسوروبیسین (Doxorubicin) و میتوکسانترون Mitoxantrone در سرطان پروستات(۱۹) یا همراه دوکسوروبیسین در دو رده سلولیMBA-MD-468 و MCF-7 سرطان سینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نتایج نشان دهنده تقویت اثر ضد سرطانی سیلیبین و هر یک از داروها بوده‌است(۱۵).

بررسی‌ها نشان داده که ترکیب‌های پلی‌فنول مانند سیلیبین برخلاف داروی هرسپتین با طیف گسترده‌تری عمل می‌کنند یعنی به میزان هرسپتین عملشان بسیار اختصاصی نیست لذا می‌توانند در بسیاری از انواع سرطان‌های سینه یا سایر سرطان‌ها کاربرد داشته باشند.

به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که تجویز ترکیب‌هایی مانند سیلیبین به همراه این داروها یا در مقطع زمانی خاص قادر است با اثر جانبی کم در کاهش بیان ژن *HER2* در سرطان‌های سینه $HER2^+$ کاربرد داشته باشد.

منابع

1. Breast Cancer: Prevention And Control. World Health Organization. Available From: URL:

Http://Www.Who.Int/Cancer/Detection/Breastcancer/En/Index1.Html

2. Isola J ,Chu L ,Devries S ,Matsumura K ,Chew K ,Ljung BM ,Waldman FM . Genetic Alterations In ERBB2-Amplified Breast Carcinomas. Clin Cancer Res 1999; 5: 4140-4145.

3. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular Genetics Of Lung Cancer. Annu Rev Med 2003; 54:73.

4. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy For Operable HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med 2005; 353:1673–1684.

5. Herceptin Trastuzumab. Available From: URL: Http://Www.Herceptin.Com/Safety.Html

Archive of SID

www.SID.ir

6. Sibilia M, Zielinski CC, Bartsch R, Grunt TW. Drugs for HER-2-Positive Breast Cancer. Springer, 2011: Vi-1

7. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3- Carbinol (I3C) Induced Cell Growth Inhibition, G1 Cell Cycle Arrest And Apoptosis In Prostate Cancer Cells. Oncogene 2001; 2:2927-2936.

8. Lippman SM, Hong WK. Cancer Prevention Science And Practice' Cancer Res 2002; 62:5119-5125.

9. Clinton SK, Giovannucci E. Diet, Nutrition, And Prostate Cancer' Annu' Rev. Nutr 1998; 18:413-440.

10. Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M. Mechanisms Involved In Chemoprevention Of Flavonoids. Biofactors 2000; 12:193-19.

11. Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Frank H, Benda L, Lochs H, Meryn S, Base W, Schneider B. Randomized Controlled Trial Of Silymarin Treatment In Patients With Cirrhosis Of The Liver. J Hepatol 1989; 9:105-13.

12. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk Thistle (Silybum Marianum) for the Therapy of Liver Disease. Am Jrn Gastroenterology 1998; 93:139- 43.

13. Gazak R, Purchartova K, Marhol P, Zivna L, Sedmera P, Valentova K, Kato N, Matsumura H, Kaihatsu K, Kren V .Antioxidant And Antiviral Activities of Silybin Fatty Acid Conjugates. European Journal of Medicinal Chemistry 2010; 45: 1059-1067.

14. Singh RP, Tyagi A , Sharma G , Mohanl S , Agarwal R. Oral Silibinin Inhibits In Vivo Human Bladder Tumor Xenograft Growth Involving Down-Regulation Of Survivin. Clin Cancer Res 2008; 14:300–308.

15. Lin CJ, Sukarieh1 R, Pelletier J. Silibinin Inhibits Translation Initiation: Implications for Anticancer Therapy. Mol Cancer Ther 2009; 8: 1606–12.

16. Dastpeyman M, Motamed N, Azadmanesh K, Mostafavi E, Kia V, Jahanian-Najafabadi A, Shokrgozar MA. Inhibition of Silibinin On Migration And Adhesion Capacity Of Human Highly Metastatic Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-231, By Evaluation Of B1-Integrin And Downstream Molecules, Cdc42, Raf-1 And D4GDI. Med Oncol 2011; 10.1007/S12032-011-0113-8, 1-7.

17. Mokhtari MJ, Motamed N, Shokrgozar MA. Evaluation of Silibinin on the Viability, Migration And Adhesion Of The Human Prostate Adenocarcinoma (PC-3) Cell Line. Cell Biology International 2008; 32: 888-892.

18. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of Disease: Understanding Resistance to HER2-Targeted Therapy In Human Breast Cancer. Nature Clinical Practice 2006; 3:269-280.

19. Flaig TW., Glodé M, Gustafson D, Bokhoven AV, Tao Y, Wilson S, Su LJ, Li Y, Harrison G, Agarwal R, Crawford ED, Lucia MS, Pollak M. A Study of High-Dose Oral Silybin-Phytosome Followed By Prostatectomy in Patients With Localized Prostate Cancer. The Prostate 2010; 1-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Survey the Effect of Silybin on HER2 in SKBR3 Breast Cancer Cell Line

Mahmoodi N.(M.Sc)[1,2]- *Motamed N.(Ph.D)[1,2]- Paylakhi S.H.(Ph.D)[3]

***Corresponding Address:** Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, IRAN

Email: Motamed2@khayam.ut.ac.ir

Received: 25/Feb/2012 Accepted: 8/Jun/2012

Abstract

Introduction: One of the most well-known oncogenes in breast cancer is *HER2* (*ERBB2* or *EGFR2*). The principal component of Milk Thistel is silybin, a polyphenolic flavonolignan isolated from silymarin, with both anti-oxidant and anti-cancer properties. Natural polyphenols are one of the most effective components for inhibiting cancers due to their high efficiency and fewer side effects.

Objective: Investigating the effect of silybin on *HER2* gene expression in SKBR3 breast cancer cell line.

Materials and Methods: First, the SKBR3 was cultured, then we used MTT assay to determine the toxicity of silybin. Finally, using RT-Real Time PCR we studied the gene expression.

Results: The cytotoxicity of silybin was evaluated by MTT assay in SKBR3 cell line in eight doses (50 - 350 µM) after 24, 48 and 72 h. Silybin showed dose and time dependent cell growth inhibitory effects in this cell line. The IC50 values of silybin after 48 and 72 h were determined to be 274/47 and 203/38, respectively. The results of Real Time RT-PCR indicated the significant down regulation of *HER2* by 150 and 250 µM of silybin after 24, 48 and 72h.

Conclusion: Silybin can be used for *HER2* positive breast cancer to down regulate *HER2* gene expression, thanks to respective fewer side effects and extensive effects on different cancers.

Key words: Breast Neoplasms/ Genes, HER2/ Silymarin

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 84, Pages: 34-41

Archive of SID

1. Department of Cell and Molecular Biology, Kish International Campus, University of Tehran, Kish, IRAN
2. Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, IRAN
3. School of Biology, University of Damghan, Damghan, IRAN

www.SID.ir