

## Original Article

### The effects of Silibinin on nitrosative stress and matrix metalloproteinase -9 expression in Balb/c mice with breast cancer tumor

Farhad Soleimani<sup>1</sup>, Rasoul Sharifi<sup>2\*</sup>, Minoo Mahmoodi<sup>3</sup>, Seyed Mehrdad Kassaei<sup>4</sup>

<sup>1</sup>PhD Student in Biochemistry, Department of Biology, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

<sup>3</sup>Department of Developmental Biology, Department of Biology, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Department of Biology, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

\*Corresponding author; E-mail: rasoulsharifi.sci@gmail.com

Received: 28 February 2019 Accepted: 29 April 2019 First Published online: 30 Dec 2020  
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021;42(5):529-536

## Abstract

**Background:** Among the factors associated with cancer are the nitrosative stress and increased expression of some Matrix Metalloproteinase (MMP). Silibinin has an anti-tumor effect, therefore, the present study evaluates the effects of silibinin on nitrosative stress indices and Matrix Metalloproteinase -9 (MMP-9) expression in the animal models of breast cancer.

**Methods:** In this study, 48 Balb/c mice were divided into 6 groups (each group contains 8 mouse): healthy (control and cancer) and treatment groups: treatment groups included cancerous mice which receiving 20 mg, 40 mg and 80 mg of silibinin for 3 weeks. In order to induce cancer, 4T1 cell line was used. After enrolling serum and breast tumor samples, NO level and MMP-9 expression in breast tumor biopsy were evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA, Kruskal-Wallis and T-test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The results revealed that the use 80 mg of silibinin resulted in significantly decreased in NO level in cancerous mice ( $170.88 \pm 15.42 \mu\text{M/ml}$ ) compared with untreated cancerous mice ( $190.38 \pm 21.19 \mu\text{M/ml}$ ) ( $p = 0.05$ ). Furthermore, the use of three dose of silibinin led to a non-significant reduction of MMP-9 in the treatment group compared to untreated cancerous mice.

**Conclusion:** Silibinin treatment has been shown to improve nitrosative stress in breast cancer mice.

**Keywords:** Silibinin, Nitrosative Stress, Matrix Metalloproteinase, Breast Cancer

**How to cite this article:** Soleimani F, Sharifi R, Mahmoodi M, Kassaei S.M. [The Effects of Silibinin on Nitrosative Stress and Matrix Metalloproteinase -9 Expression in Balb/c Mice with Breast Cancer Tumor]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020-2021;42(5):529-536. Persian.

## مقاله پژوهشی

## تأثیر سیلیبیین بر استرس نیتروزاتیو و بیان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در موش‌های بालب سی با تومور سرطان پستان

فرهاد سلیمانی<sup>۱</sup>، رسول شریفی<sup>۲</sup>، مینو محمودی<sup>۳</sup>، سید مهرداد کسای<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران  
<sup>۲</sup> گروه بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران  
<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی تکوین، گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران  
<sup>۴</sup> گروه بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران  
 rasoulsharifi.sci@gmail.com نویسنده مسئول؛

دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۹ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۹ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰  
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۵۲۹-۵۳۶

## چکیده

**زمینه:** از عوامل مرتبط با سرطان، بروز استرس نیتروزاتیو و افزایش بیان برخی از ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) است. سیلیبیین تأثیر ضد توموری دارد، بنابراین مطالعه حاضر به ارزیابی شاخص استرس نیتروزاتیو (NO) و بیان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) در مدل حیوانی سرطان پستان می‌پردازد. **روش کار:** در این مطالعه ۴۸ سر موش نژاد بालب سی، به ۶ گروه ۸ تایی شاهد (سالم، سرطانی و سالم دریافت کننده دوز ۲۰ میلی‌گرمی سیلیبیین) و تیمار تقسیم شدند. گروه تیمار، موش‌های سرطانی دریافت کننده دوز ۲۰ میلی‌گرمی سیلیبیین، دوز ۴۰ میلی‌گرمی سیلیبیین و دوز ۸۰ میلی‌گرمی سیلیبیین به مدت سه هفته بودند. برای ایجاد سرطان از رده سلولی 4T1 استفاده شد. پس از اخذ نمونه‌های توموری پستان و سرم، میزان نیتریک اکسید (NO) با استفاده از کیت الایزا و بیان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) با استفاده از Real-time PCR ارزیابی شدند. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، کروسکال وایس و آزمون تی آنالیز شدند ( $p < 0.05$ ).

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که مصرف سیلیبیین در دوز ۸۰ mg منجر به کاهش معنادار سطح NO در سرم موش‌های سرطانی (۱۷۰/۸۸±۱۵/۴۲) میکرومول بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه سرطانی بدون تیمار (۱۹۰/۳۸±۲۱/۱۹) میکرومول بر میلی‌لیتر) گردید ( $p=0.05$ ). سیلیبیین در هر سه دوز منجر به کاهش بیان بدون تفاوت آماری MMP-9 در مقایسه با گروه سرطانی بدون تیمار شد. **نتیجه‌گیری:** مصرف سیلیبیین منجر به بهبود استرس نیتروزاتیو در موش‌های با سرطان پستان شد.

**کلید واژه‌ها:** سیلیبیین، استرس نیتروزاتیو، MMP-9، سرطان پستان

**نحوه استناد به این مقاله:** سلیمانی ف، شریفی ر، مینو محمودی م، کسای س م. تأثیر سیلیبیین بر استرس نیتروزاتیو و بیان ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ در موش‌های بालب سی با تومور سرطان پستان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۵): ۵۲۹-۵۳۶

حق تالیف برای مولفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

## مقدمه

در بیشتر کشورها شیوع سرطان پستان ۱ الی ۲ درصد در هر سال رشد داشته و سالانه یک میلیون نفر مورد جدید به این میزان اضافه می‌شود (۱). بر اساس مطالعات و پژوهش‌های انجام‌شده، ارتباط استرس نیتروزاتیو با سرطان‌زایی و بروز انواع سرطان به اثبات رسیده است (۲). نیتریک اکسید (NO) می‌تواند به عنوان یک عامل آپوتوتیک و نیز عامل آنتی‌آپوتوتیک عمل کند (۳) ولی در سرطان‌های اپیتلیال بیشتر نقش آنتی‌آپوتوتیک را ایفا می‌کند به طوری که با اتصال به گیرنده خود منجر به فعال شدن سیگنال مهاجرت سلول‌های سرطانی می‌شود و در رگ‌زایی، حمله سلول‌های تومور و متاستاز، یک ضرورت محسوب می‌شود (۴). افزایش مقدار NO در خون بیماران با سرطان سینه در مقایسه با افراد سالم مشاهده شده است (۵). بیان آنزیم تولیدکننده NO، یک رویداد اولیه در سرطان‌زایی است (۶). از طرف دیگر مشخص شده است که ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) نقش مرکزی در عبور و مرور مواد به سلول سرطانی داشته و سطح پلاسمایی آنها به عنوان بیومارکر در سرطان‌های مختلف شناخته شده است (۷). این پروتئین‌ها کلاس‌های مختلفی را شامل می‌شوند که از میان آنها، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) یک ژلاتیناز است که نقش مهمی در تجزیه و تهاجم سلول سرطانی با تجزیه کلاژن نوع پنج، که در غشای پایه فراوان است، بازی می‌کند (۸). طیف وسیعی از مطالعات نشان می‌دهد که سیلیبیین خاصیت ضد سرطان پستانی دارد، و اثرات توکسیسیته آن روی چندین رده سلول سرطانی پستان و مهار رشد آنها اثبات شده است (۹). آنتی‌اکسیدان قوی سیلیبیین یک پلی‌فنول طبیعی و یک فلاونوئید است که به طور گسترده به عنوان یک مکمل غذایی مصرف می‌شود و بخش اعظم بیولوژیکی پروتئین فعال گیاه استخراج شده از خار مریم (Milk thistle) با نام علمی *Marianum Silybum* را که متعلق به تیره کاسنی است، تشکیل می‌دهد (۱۰). با توجه به اینکه MMP-9 و NO بازیگران مهم انواع سرطان‌ها می‌باشد و سیلیبیین به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی، امروزه توجه زیادی را به‌خود جلب کرده و اثرات مفید آن در مطالعات مختلف مشهود بوده و از طرف دیگر تاثیر آن بر روی این دو فاکتور در مدل حیوانی سرطان پستان مطالعه نشده است، مطالعه حاضر به تاثیر سیلیبیین بر استرس نیتروزاتیو و بیان MMP-9 در مدل حیوانی سرطان پستان می‌پردازد.

## روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی و نمونه آماری آن، شامل ۴۸ سر موش نژاد بلب سی ۷-۶ هفته‌ای با وزن ۱۹-۲۴ گرم بود (۱۱). رده سلولی متاستاتیک سرطانی سینه 4T1 پس از خریداری و کشت بافت در روز صفر آزمایش بصورت زیرجلدی، مجاور

## نکات کاربری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و انجام تحقیقات بیشتر، می‌توان تصور کرد که در پیشگیری و درمان سرطان سیلیبیین، می‌تواند، موثر واقع شود.

پایین‌ترین غده پستانی سمت چپ، تزریق شد و پس از دو هفته که تومور نمایان شد تیماردهی آغاز گردید (۱۲). حیوانات به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه ۱، موش‌های کنترل و دست نخورده. گروه ۲، موش‌های با تومور سینه بدون درمان که آب مقطر دریافت کردند. گروه ۳، موش‌های سالم دریافت‌کننده دوز ۲۰ میلیگرم بر کیلوگرم سیلیبیین. گروه ۴، موش‌های سرطانی دریافت‌کننده دوز ۲۰ میلیگرم بر کیلوگرم سیلیبیین و گروه ۵، موش‌های سرطانی دریافت‌کننده دوز ۸۰ میلیگرم بر کیلوگرم سیلیبیین. تمام حیوانات با شرایط یکسان در دوره‌های متوالی نوری ۱۲ ساعت در روشنایی و ۱۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند و مطالعه بر اساس دستورالعمل معرفی شده توسط اینستیتو ملی بهداشت آمریکا برای استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و راهکارهای عملی موجود در داخل کشور به انجام رسید. نشان داده شده است که دوز ۱۲۰ میلیگرم سیلی مارین (مخلوطی از شش فلاونولیکان است که سیلیبیین به دو فرم A و B حدود ۹۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد) - که سیلیبیین جز اصلی تشکیل‌دهنده آن است - کشنده می‌باشد به این علت از دوزهای پایین استفاده شد (۱۳). سیلیبیین بصورت داخل صفاقی، به مدت سه هفته تجویز گردید. گروه‌های دریافت‌کننده سیلیبیین، از روز پانزدهم تزریق (مدت زمان لازم برای نمایان شدن تومور) به مدت سه هفته (بر اساس مطالعات قبلی زمان بهینه تزریق بصورت داخل صفاقی، معمولاً دو الی سه هفته است) تزریق داخل صفاقی، معمول‌ترین و مهم‌ترین روش تجویز داروها در جوندگان می‌باشد، چرا که محوطه صفاقی علاوه بر وسعت زیاد خود، دارای رگ‌های فراوانی می‌باشد و لذا محلول‌هایی که در حجم‌های نسبتاً بالایی تزریق می‌شوند در مدت کوتاهی بعد از تزریق، وارد گردش خون عمومی می‌شوند (۱۴). از طرف دیگر چون حلالیت سیلیبیین در لیپیدها کم می‌باشد، گذر آن از غشای سلول‌های روده محدود بوده و در نتیجه جذب روده‌ای کمتری دارد، بنابراین بصورت داخل صفاقی تجویز شد (۱۵). پس از این مدت به میزان ۱۰۰ میلیگرم از بافت توموری سینه برداشته شده و بیان MMP-9 ارزیابی شد و از نمونه‌های سرمی به منظور ارزیابی استرس نیتروزاتیو استفاده گردید.

**کشت سلول:** رده سلولی 4T1 از اینستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و

گریس بر روی نمونه مورد آزمایش اضافه می‌شود، که موجب تبدیل نیتريت به ترکیبی بنام آزو (Azo) به رنگ زرشکی سیر می‌گردد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۱۸).

#### ارزیابی سطح بیان MMP-9

استخراج RNA توتال با استفاده از کیت Total RNA Mini-Preps Kit (Bio Basic Canada Inc. Lot# BS1361-140929) انجام گرفت. پس از استخراج، کنترل کمی RNA ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) انجام شد. کنترل کیفی آنها نیز با استفاده از الکتروفورز ژل یک درصد و با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید صورت گرفت (تصویر ۱).

نخستین رشته cDNA طبق دستورالعمل کیت و آنزیم رونوشت‌بردار M-MLV (Takara, Japan, Lot#AK4901) با استفاده از یک میکروگرم RNA توتال، تولید شد. برای اطمینان از کیفیت cDNA ساخته شده، یک واکنش PCR برای ژن خانه‌گردان GAPDH انجام شد. در این واکنش، به عنوان الگو از cDNA ساخته شده و از DNA پلیمرز SmartTaq استفاده شد و به منظور اطمینان از صحت انجام PCR الکتروفورز در ژل ۱/۵ درصد صورت گرفت. با استفاده از تکنیک SYBR Green Real Time PCR، بیان ژن MMP-9 کمی‌سازی شد. این کار با استفاده از QuantiTect SYBR Green PCR kit + UNG kit (Takara, Japan, Lot#AK4801) انجام شد. برای انجام واکنش PCR از دستگاه Corbet Rotor gene 6000 استفاده شد. پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، سیکل آستانه (CT) هر نمونه بدست می‌آید. از نسبت سیکل آستانه ژن مورد نظر با ژن GAPDH به عنوان ژن خانه گردان می‌توان میزان بیان نسبی ژن مورد نظر را از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  بدست آورد. PCR هرکدام از ژن‌ها، سه بار تکرار شد و بعد از بدست آمدن مقادیر CT، آنالیز انجام و نمودار رسم شد. طراحی پرایمرهای Real time با استفاده از پایگاه داده بیوانفورماتیکی NCBI و نرم‌افزار پرایمر نسخه ۳ و ۷ oligo انجام شد. جهت سنتز، ارسال و از شرکت BIONEER خریداری گردید. توالی پرایمرهای مربوط به ژن MMP-9 بصورت

Forward primer: ATCCGGCAAACCTGGCTCCTTC  
Reverse primer: ATTTCTGCCAGGACCGCTTCTAC  
ژن GAPDH بصورت

Forward primer: GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC  
Reverse primer: GAAGATGGTGATGGGATTTTC  
بود.

#### GAAGATGGTGATGGGATTTTC آنالیز آماری داده‌ها

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ آنالیز شدند. پس از بدست آوردن میانگین NO، مقایسه میانگین بین

استرپتومایسین و غلظت ۴/۵ گرم بر لیتر گلوکز و اکسیژن کشت داده شد. میزان CO<sub>2</sub> انکوباتور کشت سلولی ۵٪ و درجه حرارت آن ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. فلاسک‌های کشت سلولی بررسی میکروسکوپی شدند تا به الحاق حدود ۹۰-۸۰٪ رسیده و نیز هیچ آلودگی باکتریایی و قارچی نداشته باشند. محیط کشت قبلی هر فلاسک دور ریخته شد و پس از دوبار شستشو با PBS، محلول تریپسین/EDTA اضافه شده و فلاسک‌ها حدود ۳ تا ۵ دقیقه به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵٪ انتقال یافتند. پس از مطالعه با میکروسکوپ معکوس، به منظور غیر فعال شدن تریپسین مقدار ۲ میلی‌لیتر محیط حاوی FBS به هر فلاسک افزوده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از این محلول جهت شمارش سلول‌ها برداشته شده و بقیه به فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتر مربعی انتقال یافتند و پس از بررسی میکروسکوپی مانند حالت قبل، به انکوباتور منتقل شدند. برای تعیین زنده‌مانی و شمارش سلولی به ترتیب از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد (۱۶). در رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ حیاتی تریپان بلو به دلیل اینکه از ورود رنگ به داخل سلول‌های زنده ممانعت می‌شود، این سلول‌ها به صورت شفاف و بی‌رنگ دیده می‌شوند، حال آنکه در سلول‌های مرده به دلیل از بین رفتن فعالیت غشا، رنگ قادر است وارد سلول‌ها شده و لذا به صورت آبی رنگ مشاهده می‌گردند. به منظور تزریق سلول‌ها برای ایجاد تومور، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه گردید. سپس به هر موش بلب سی ماده، یک میلیون سلول، مجاور پایین‌ترین غده پستانی سمت چپ، تزریق شد. در پایان روز ۲۱، پس از خون‌گیری از قلب موش‌ها و قربانی کردن آنها با جابجایی مهره گردنی، بافت توموری سینه برداشته شده و در تانک ازت در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تومور در ظرف هموژنایزر حاوی محلول لیزات قرار داده شد تا بافت کاملاً لیز شود و سپس سوسپانسیون رویی جمع‌آوری گردید و پس از انجام سانتریفیوژ، از سوپرناتانت، برای بیان MMP-9 و از سرم نیز به منظور ارزیابی سطح NO، استفاده شد.

#### اندازه‌گیری حجم تومور

حجم تومور با رابطه  $V = (L * W * W) / 2$  محاسبه شد، که V حجم تومور، L طول تومور و W عرض تومور می‌باشد (۱۷).

#### اندازه‌گیری NO

برای اندازه‌گیری میزان NO از کیت ZellBio GmbH ساخت کشور آلمان با مشخصات CAT No. ZB-NO-96A استفاده شد که بر اساس روش کالریمتری گریس (Griess) است. روش کالریمتری گریس، یک روش مستقیم و ساده جهت اندازه‌گیری دو متابولیت نیتریک اکسید یعنی نیترات و نیتريت می‌باشد که طی دو مرحله ساده انجام می‌گیرد. در مرحله اول توسط واکنش احیا، نیترات را به نیتريت تبدیل کرده و سپس در مرحله دوم معرف

بین گروه سرطان و سرطان همراه با ۸۰ میلیگرم سیلیبیین برابر با ۰/۰۰۱ بود، که نشان می‌دهد هر سه دوز سیلیبیین در مقایسه با موش‌های سرطانی بدون تیمار، تاثیر معنی‌داری در کاهش حجم تومور در روز ۲۱ داشتند، که بیشترین تاثیر مربوط به دوز ۸۰ میلیگرمی سیلیبیین بود.

**نتایج حاصل از مقایسه میانگین NO در گروه‌های مورد مطالعه**

همانطور که نمودار ۱ نشان می‌دهد مصرف سیلیبیین (دوز ۸۰ میلیگرمی)، باعث کاهش معنادار NO سرم موش‌های سرطانی در مقایسه با موش‌های سرطانی بدون درمان شد و این تاثیر در دو دوز دیگر، معنادار نبود.

**نتایج حاصل از مقایسه بیان MMP-9 در گروه‌های مورد مطالعه**

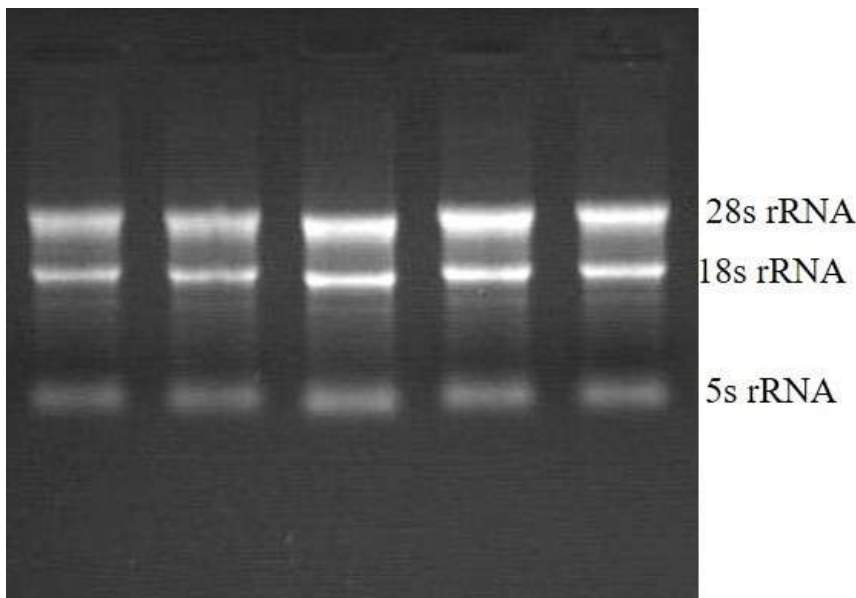
همانطور که نمودار ۲ نشان می‌دهد، مصرف سیلیبیین، باعث کاهش بدون تفاوت آماری بیان MMP-9 در بافت توموری پستان در مقایسه با موش‌های سرطانی بدون درمان شد و این تاثیر برای تمامی دوزها غیر معنادار بود.

گروه‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه نتایج بین دو گروه از آزمون تی تست استفاده شد. در مورد نتایج بدست آمده برای میزان بیان ژن MMP-6، نرمال بودن توزیع نتایج توسط آزمون کروسکال والیس بررسی و برای مقایسه نتایج بین دو گروه از آزمون من - ویتنی استفاده شد و سطح معناداری در سطح  $p < 0/05$  بود.

**یافته‌ها**

**نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور**

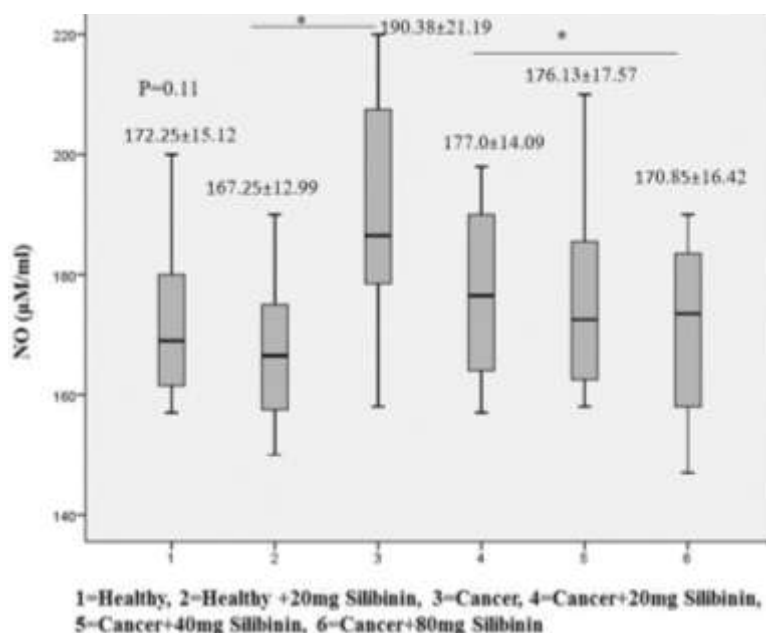
جدول ۱ نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور را در گروه‌های مربوطه نشان می‌دهد. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد دوز ۸۰ میلیگرمی تاثیر بهاری بیشتری بر روی رشد تومور داشت. همچنین تفاوت حجم تومور در روز ۲۱، بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد، بطوری که  $p$  بین گروه سرطان و سرطان همراه با ۲۰ میلیگرم سیلیبیین برابر با ۰/۰۰۳، بین گروه سرطان و سرطان همراه با ۴۰ میلیگرم سیلیبیین برابر با ۰/۰۰۳ و در نهایت



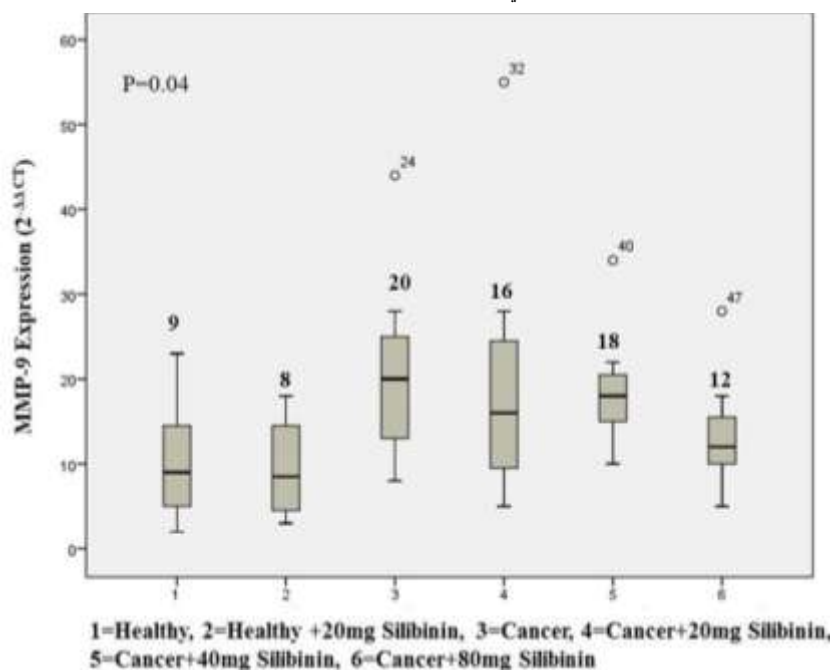
تصویر ۱: ارزیابی کیفی RNA استخراج شده

جدول ۱: نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور در گروه‌های مربوطه ( $p=0/00$ )

گروه‌ها	حجم تومور در روز اول ( $mm^3$ )	حجم تومور در روز ۲۱ ( $mm^3$ )	P
سرطان	۵۹/۱۷ ± ۶/۶۴	۱۳۷/۵۰ ± ۲۴/۸۵	۰/۰۰
سرطان + ۲۰ میلیگرم سیلیبیین	۶۳/۱۷ ± ۶/۸۴	۱۰۸/۳۳ ± ۱۴/۳۷	۰/۰۰۱
سرطان + ۴۰ میلیگرم سیلیبیین	۵۷/۸۳ ± ۸/۴۴	۹۲/۵۰ ± ۱۴/۰۵	۰/۰۰
سرطان + ۸۰ میلیگرم سیلیبیین	۵۴/۸۳ ± ۷/۰۸	۸۳/۸۳ ± ۱۰/۸۷	۰/۰۰۱



نمودار ۱: مقایسه میانگین NO سرمی در گروه‌های مورد مطالعه (معنی داری در سطح  $P \leq 0.05$ ). با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، نتایج هر گروه بصورت  $M \pm SD$  بالای هر میله نشان داده شده است.



نمودار ۲: مقایسه میانگین بیان MMP-9 در گروه‌های مورد مطالعه. با افزایش دوز سیلیبینین کاهش بیان این ژن مشاهده شد که در مقایسه با گروه سرطان بدون تیمار، بدون تفاوت آماری بود. با توجه به توزیع غیرنرمال داده‌ها، نتایج هر گروه بصورت میانه، بالای هر میله نشان داده شده است.

موجود در ساختار خود، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل GPX و SOD شده و موجب تحریک بیان فاکتورهای رونویسی آنتی‌اکسیدانی، مهار آنزیم‌های آزاد کننده رادیکال آزاد و کاهش پاسخ‌های التهابی با مهار مسیرهای NF-κB گردیده و از این راه منجر به ارتقا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن در

## بحث

سیلیبینین خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدالتهابی قابل ملاحظه‌ای دارد و به علت ایمن بودن و نبود عوارض جانبی، بطور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹،۲۰). سیلیبینین با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد بخصوص از طریق پیوندهای دوگانه

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سیلیبیین در دوزهای پایین، سبب بهبود وضعیت استرس نیتروژاتیو از راه کاهش میزان NO می‌شود.

### قدردانی

مقاله حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی دکتری به شماره 171481582272654162261658 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان است. نویسندگان این مقاله لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی واحد و دانشکده، کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

### ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی این مطالعه، بر اساس راهنمای اصول اخلاق در پژوهش مرتبط با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد.

### منابع مالی

ندارد.

### منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله ندارند.

### مشارکت مؤلفان

ف س، ر ش و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را عهده داشت. همچنین ر ش و م م مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

شرایط استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو می‌شود (۲۱ و ۲۲). سیلیبیین به نظر می‌رسد که عامل حفاظتی مهمی در ترمیم آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد در شرایط پاتولوژیکی مختلف باشد (۲۱). خان و همکاران (۲۳) گزارش کردند که تزریق سیلیبیین، تومورزایی را در پوست مهار کرده و استرس اکسیداتیو و التهاب را با کاهش NO و اینترلوکین-۶، می‌کاهد. در مطالعه حاضر نیز تجویز سیلیبیین منجر به کاهش معنادار NO شد (نمودار ۱). از طرف دیگر نشان داده شده است که سطوح پروتئین نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و یا فعالیت آن ارتباط مثبتی با درجه بدخیمی در تعدادی از سرطان‌ها دارد. تولید NO، رگ‌زایی را تحریک می‌کند و بنابراین می‌تواند هدف بالقوه‌ای برای کنترل رگ‌زایی تومور باشد (۲۴). مطالعه کیتزات و همکاران (۲۵)، نشان داد که تیمار با سیلیبیین بطور کامل منجر به مهار بیان آنزیم نیتریک اسید سنتاز القایی در سلول‌های سرطانی ریه و در نتیجه منجر به کاهش تولید NO شد. یکی از جدیدترین اثرات کشف شده سیلیبیین، توانایی آن در تغییر بیان ماتریکس متالوپروتئینازهای مختلف در سلول‌های گوناگون می‌باشد. از این طریق سیلیبیین توانسته است اثرات مفید قابل توجهی بخصوص در مبحث سرطان نشان دهد. مطالعه کیم و همکاران (۲۶) نشان داد که در سلول‌های سرطان پستان انسان، سیلیبیین مانع از بیان MMP-9 از طریق کاهش بیان سیکلوآکسیژناز-۲ می‌شود. مطالعه لو و همکاران (۲۷)، نشان داد که سیلیبیین منجر به مهار مهاجرت و تهاجم سلولی از طریق کاهش بیان MMP-2 و MMP-9 در سلول‌های سرطانی معده انسانی گردید. همچنین مطالعه اوه نشان داد که دوز ۵۰ میکرومولار سیلیبیین مهاجرت سلولی و بیان MMP-9 را در سلول‌های سرطانی تیروئید و سینه، بطور کامل مهار می‌کند (۲۸) و این فعالیت با مهار فسفریلاسیون کینازهایی همچون MEK و ERK در این سلول‌ها توسط سیلیبیین، صورت می‌گیرد.

## References

- Genç A, Can G, Aydinler A. The efficiency of the acupressure in prevention of the chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Support Care Cancer*. 2013 Jan;21(1):253-61. doi: 10.1007/s00520-012-1519-3.
- M. Calaf G, Urzua U, Termini L, Aguayo F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget*. 2018;9(34): 23824-42. doi: 10.18632/oncotarget.25323
- Li CQ, Wogan GN. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Letters*. 2005 Aug 8;226(1):1-5.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013 Dec;11(1):1-1. doi: 10.1186/1477-7819-11-1188
- Hewala TI, El-Moneim NA, Ebied SA, Sheta MI, Soliman K, Abu-Elenean A. Diagnostic and prognostic value of serum nitric oxide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , basic fibroblast growth factor and copper as antigenic markers in premenopausal breast cancer patients: A case-control study. *British Journal of Biomedical Science*. 2010 Jan 1;67(4):167-76. doi:10.1080/09674845.2010.11730315.
- O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance: NO and MMP-9 interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014 Mar 1;1843(3):603-17. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.12.006
- Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Nov 1;27(31):5287. doi:10.1200/jco.2009.23.5556

8. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):52-67. doi : 10.1016/j.cell.2010.03.015.
9. Kauntz H, Bousserouel S, Gosse F, Marescaux J, Raul F. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. *International Journal of Oncology*. 2012 Sep 1;41(3):849-54. doi: 10.3892/ijo.2012.1526
10. Loguercio C, Festi D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011 May 14;17(18):2288. doi: 10.3748/wjg.v17.i18.2288
11. Hashemi HS, Hosseini SA. The effect of moderate intensity endurance training and lipid lowering genistein in Streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2017 Apr 15;19(1):10-23. [In Persian].
12. Farhangi B, Etyabi F, Hassan Saraf Z. VEGF and MMP-9 Gene Expression Caused by Treatment with Helicobacter Pylori Neutrophil-activating Recombinant Protein in a Breast Cancer Model. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2015 Mar 10;17(3):13-9. [In Persian].
13. Hemayatkhah Jahromi V. The Investigation of silymarin effect on colon ulcer induced acetic acid in mice. *JCT*. 2011; 1(2): 21-28.
14. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, S. Haddad P. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011. doi: 10.1093/ecam/nep164.
15. Wu JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Nov 30;45(4):635-41. doi: 10.1016/j.jpba.2007.06.026.
16. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1999;299:15-27. doi: 10.1016/s0076-6879(99)99005-5.
17. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Feb;108(2):343-8. doi: 10.1152/jappphysiol.00424.2009.
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 1982 Oct 1;126(1):131-8. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x
19. Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*. 2015 Mar;4(1):204-47. doi: 10.3390/antiox4010204.
20. Kauntz H, Bousserouel S, Gosse F, Marescaux J, Raul F. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. *International Journal of Oncology*. 2012 Sep 1;41(3):849-54. doi: 10.3892/ijo.2012.1526.
21. Prabu SM, Muthumani M. Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Molecular Biology Reports*. 2012 Dec 1;39(12):11201-16. doi: 10.1007/s11033-012-2029-6.
22. Kim BR, Seo HS, Ku JM, Kim GJ, Jeon CY, Park JH, et al. Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells. *Inflammation Research*. 2013 Nov 1;62(11):941-50. doi: 10.1007/s00011-013-0640-1
23. Khan AQ, Khan R, Tahir M, Rehman MU, Lateef A, Ali F, et al. Silibinin inhibits tumor promotional triggers and tumorigenesis against chemically induced two-stage skin carcinogenesis in Swiss albino mice: possible role of oxidative stress and inflammation. *Nutrition and Cancer*. 2014 Feb 1;66(2):249-58. doi: 10.1080/01635581.2014.863365
24. Singh RP, Agarwal R. Inducible nitric oxide synthase-vascular endothelial growth factor axis: a potential target to inhibit tumor angiogenesis by dietary agents. *Current Cancer Drug Targets*. 2007 Aug 1;7(5):475-83. doi: 10.2174/156800907781386632
25. Chittezhath M, Deep G, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits cytokine-induced signaling cascades and down-regulates inducible nitric oxide synthase in human lung carcinoma A549 cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008 Jul 1;7(7): 1817-26. doi: 10.1158/1535-7163.mct-08-0256
26. Kim S, Kim SH, Hur SM, Lee SK, Kim WW, Kim JS, et al. Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression by down-regulation of COX-2 in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009 Nov 12;126(2):252-7. doi: 10.1016/j.jep.2009.08.032
27. Lu S, Zhang Z, Chen M, Li C, Liu L, Li Y. Silibinin inhibits the migration and invasion of human gastric cancer SGC7901 cells by downregulating MMP-2 and MMP-9 expression via the p38MAPK signaling pathway. *Oncology letters*. 2017 Dec 1;14(6):7577-82. doi: 10.3892/ol.2017.080
28. Oh SJ, Jung SP, Han J, Kim S, Kim JS, Nam SJ, et al. Silibinin inhibits TPA-induced cell migration and MMP-9 expression in thyroid and breast cancer cells. *Oncology Reports*. 2013 Apr 1;29(4):1343-8. doi: 10.3892/or.2013.2252