

مقاله پژوهشی

اثرات ضد توموری ترکیبی از اسانس سیلیبیوم ماریانوم و ۵-فلورویوراسیل بر سلول‌های کبدی (HepG2)

محمد جابر مسعود خوی^۱، محمدرضا صالحی سلمی^۲، معصومه فراست^۱، حامد میرزائی^{۳*}

۱- گروه باغبانی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- استاد مدعو گروه باغبانی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران و عضو هیئت علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

۳- استاد مدعو گروه باغبانی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و

تغذیه در بیمارهای متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

*مسئول مکاتبات: mirzaei-h@kaums.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1938139.1291

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۶

چکیده

سرطان سلول‌های کبدی (HCC) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سرتاسر جهان می‌باشد و نسبت به داروهای شیمی‌درمانی مانند دوکسوروبیسین و ۵-فلورویوراسیل (5-FU) مقاوم می‌باشد. عصاره سیلیبیوم ماریانوم یا ترکیب فعال سیلی مارین آن خاصیت ضدسرطانی دارد و پیشنهاد شده است که به عنوان یک عامل جایگزین و مکمل در درمان می‌تواند استفاده می‌شود. در این مطالعه تأثیرات ترکیبی اسانس سیلیبیوم ماریانوم و 5-FU برای سرکوب رشد HCC در شرایط آزمایشگاهی با تأثیر بر مسیرهای Wnt، NF- κ B، رگزائی، آپوپتوز و اتوفازی بررسی شد. بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی NF- κ B و Wnt و همچنین فاکتورهای مربوط به رگزائی، آپوپتوز و اتوفازی با استفاده از تکنیک‌های وسترن بلات و qRT-PCR بررسی شد. براساس نتایج بدسن آمده همه تیمارها در مقایسه با گروه کنترل، زیستایی سلول‌های HepG2 را کاهش دادند. علاوه بر این، اسانس سیلیبیوم ماریانوم خوزستان یا اصفهان (Sm-I و Sm-K) در ترکیب با 5-FU، مهاجرت و تهاجم را در سلول‌های HepG2 را کاهش داد. از لحاظ آماری میانگین بیان پروتئین‌های مرتبط با رگزائی (VEGF، COX-2، Bfgf و HIF-1 α)، آپوپتوز (Bcl-2، Bax و کاسپاز-8)، اتوفازی (Beclin-1، LC3-I و LC3-II) و NF- κ B (total NF- κ B (p65) و phospho NF κ B (p65)) به میزان قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل تغییر یافته است. علاوه بر این، سطوح بیان ژن‌های مرتبط با مسیر Wnt نیز کاهش یافت. روی هم رفته، یافته‌ها نشان داد که سیلیبیوم ماریانوم به تنهایی یا در ترکیب با 5-FU می‌تواند از طریق تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی اتوفازی، آپوپتوز، رگزائی، NF κ B و Wnt، اثرات ضدتومور ایجاد کند.

کلمات کلیدی: رگزائی، سرطان سلول‌های کبدی، اسانس سیلیبیوم ماریانوم، ۵-فلورو اوراسیل، درمان ترکیبی.

مقدمه

یکی از علل عمده مرگ و میرهای ناشی از سرطان در سراسر جهان مربوط به سرطان سلول‌های کبدی (HCC) است (۵). عفونت‌های ویروسی مانند هپاتیت B و C و همچنین بیماری‌های خود ایمن، مصرف

را تولید کنند که به رگ‌زایی و پیشرفت بدخیمی کمک کننده می‌باشند (۴۷). علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که مسیرهای پیام‌رسانی موثر بر متابولیسم، آپوپتوز، تکثیر یا رشد سریع سلول و چرخه سلولی بر پیشرفت HCC تأثیر می‌گذارد (۲۰). علاوه بر این، از مسیرهایی که به پیشرفت بدخیمی سلول‌های کبدی کمک می‌کند فعال شدن و افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر Wnt/ β -catenin، Myc و مسیر کیناز B (PI3K/Akt) می‌باشد که کنترل سطح بیان فاکتورهای درگیر در فعال شدن بیش از حد این مسیرها به عنوان اهداف درمانی در مطالعات مختلف مطرح شده است (۲۴، ۳۱، ۴۱). علاوه بر این، مقاومت در برابر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده که ناشی از کاهش بیان ژن‌های محرک آپوپتوز (مانند کاسپاز-۸ و Bax)، افزایش بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز (مانند Bcl-2)، مهار اتوفاژی (کاهش سطح بیان ژن‌های محرک اتوفاژی مثل Beclin-1، LC3-I و LC3-II) یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های سرطانی است که منجر به کاهش اثر بخشی شیمی درمانی شده و به پیشرفت سلول‌های سرطانی به سمت متاستاز کمک کننده می‌باشد. به طور کلی هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات ترکیبی سیلی بیوماریانوم و 5-FU بر روی سطح بیان فاکتورهای درگیر در رگ‌زایی، آپوپتوز، اتوفاژی، NF- κ B و ژن‌های درگیر در مسیر Wnt بر روی رده سلولی HepG2 در مقایسه با 5-FU، سیلی بیوماریانوم اصفهان (Slm-I) و سیلی بیوماریانوم خوزستان (Sml-K) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها: استرپتومایسین، پودر MTT، 5-FU، تریپسین، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، ماتریژل و پنی سیلین از شرکت سیگما

الکل، چاقی و دیابت فاکتورهای خطر HCC هستند و HCC به عنوان یکی از چالش‌های بهداشتی محسوب می‌گردد (۹، ۳). سیلی بیوماریانوم یا خارمریم گیاهی است که به طور گسترده برای درمان بیماری‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفته است. ماده فعال آن یک عصاره چربی دوست یا همان اسانس دانه‌های گیاه و حاوی سه فلاونوئیدگن ایزومری (سیلیدیانین، سیلی کریستین و سیلیین) است که در مجموع سیلیمارین نامیده می‌شود. این ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که از پراکسیداسیون لیپید و تولید رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند. این دارو برای درمان بیماری‌های مختلف مانند آسیب کبدی ناشی از سموم، بیماری کبد الکلی و هپاتیت ویروسی استفاده می‌شود و برای درمان HCC تحت بررسی است. در طب سنتی، برای درمان اختلالات کبدی مانند سیروز، هپاتیت، کاهش کلاسترول و مقاومت به انسولین در دیابت ملیتوس نوع II از عصاره دانه‌های سیلیمارین، شیره خارمریم و کپسول‌های ژله‌ای استفاده گسترده‌ای می‌شود (۲۷).

۵-فلوروپوراسیل (5FU) یک داروی شیمی درمانی است که به عنوان یک ضد متابولیت عمل می‌کند و از تیمیدیلات سنتاز و سنتز RNA/DNA جلوگیری می‌کند (۴۵). 5-FU به عنوان یک داروی استاندارد برای درمان HCC، به عنوان بخشی از ترکیب 5-FU، لوکوورین و اگزالی پلاتین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۵). با این حال، عدم اثربخشی نسبی توسط 5-FU منجر به تلاش‌های زیادی برای تقویت اثرات ضدتوموری آن شده است. این تلاش‌ها شامل ترکیب آن با سایر عواملی است که مکانیسم عمل متفاوتی دارند. یکی از ویژگی‌های تمامی سلول‌های سرطانی از جمله HCC رگ‌زایی سلول‌های سرطانی است که به گسترش، متاستاز و تهاجم آن کمک می‌کند (۲۳). سلول‌های HCC می‌توانند عوامل مختلف پیش-رگ‌زایی از جمله bFGF، COX-2 و همچنین VEGF

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شده و تکان داده شد. همچنین برای اندازه‌گیری میزان جذب از میکروپلیت خون در طول موج ۵۷۰ نانومتر (۳۰) استفاده شد. IC50 (۵۰ درصد غلظت مهار) در مقایسه با شاهد تعیین شد.

ارزیابی تهاجم: از یک محفظه اصلاح شده بویدن و پوشانده شده با ماتریژل برای آنالیز تهاجم سلولی استفاده شد. همان تیمارهایی که در بخش ۲.۴ شرح داده شد به مدت شش ساعت در محفظه فوقانی شامل ۵۰۰ میکرولیتر محیط بدون سرم و $10^4 \times 2.5$ سلول HepG2 انجام شد. بعد از آن ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت در محفظه پایینی ریخته شد. پس از ۶ و ۱۲ ساعت، تمام سلول‌های غیرمهاجم با استفاده از یک سواب پنبه ای از محفظه فوقانی خارج شدند. در مرحله بعد، سلول‌های محفظه تحتانی را با پارافورمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت و سپس با کریستال ویوله ۰/۵ درصد به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی شد. کریستال ویوله اضافی با آب مقطر شسته شد. در نهایت، با استفاده از یک میکروسکوپ Axioplan-2 با عدسی Zeiss Plan-Apochromat 100 سلول‌های رنگ‌آمیزی شده را بررسی گردید.

ارزیابی مهاجرت: در یک پلیت ۶ خانه، 3×10^5 سلول HepG2 کشت داده شد. سلول‌های HepG2 به تلاقی ۸۰ درصد رسیدند. مواد تیمارها در محیط کشت بدون FBS قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۶ یا ۱۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، با استفاده از نوک پیپت زرد، خراشی را در تک لایه سلول‌ها ایجاد گردید. برای ارزیابی سلول‌های رنگ آمیزی شده (پس از ۶ و ۱۲ ساعت)، از یک میکروسکوپ Axioplan-2 با عدسی Zeiss Plan-

(سنت لوئیس؛ MO: ایالات متحده آمریکا) خریداری شد.

اسانس سیلیبیوم ماریانوم: در این مرحله، پودر آسیاب شده دانه‌های سیلیبیوم ماریانوم (تهیه شده از استانهای اصفهان و خوزستان) در آب مقطر با غلظت ۱۰ درصد وزنی/حجمی خیسانده شده تا اسانس تهیه شود. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق تحت چرخش مداوم قرار گرفت. سپس مایع رویی را جمع کرده و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ آر پی ام سانتریفیوژ کرده سپس محلول فوقانی شفاف برای استفاده در سنجش‌ها ذخیره گردید (۳۲).

کشت سلولی: سلول‌های HepG2 در محیط کشت RPMI 1640 در فلاسک‌های کشت سلولی T25 کشت داده شدند. از پنی‌سیلین/استرپتومایسین (۱) درصد حجمی/حجمی و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد همراه با محیط کشت استفاده شد. سپس، سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند.

اندازه‌گیری زیست‌تایی سلول: برای ارزیابی سمیت Sm-K، Sm-I، Sm-K، Sm-I، 5FU، Sm-I+5-5FU و Sm-K+5-5FU بر روی رده سلولی HepG2، از روش MTT استفاده شد. بدین منظور 1×10^4 سلول HepG2 در یک پلیت ۹۶ خانه همراه با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کاشته شد. پلیت به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از شستشو با PBS، غلظت‌های صعودی اسانس برابر با ۰/۳۱، ۰/۶۲، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و 5-FU برابر ۰/۱۵، ۰/۳۱، ۰/۶۲، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت رشد کردند. هیچ سلول تیمار شده ای را به عنوان شاهد در نظر نگرفتیم. در مرحله بعد، ۱۰ میکرولیتر MTT (۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) روی همه چاهک‌ها ریخته شد و به مدت سه

برای تعیین غلظت پروتئین از کیت BCA (پیرس راکفورد: ایالات متحده) استفاده شد. سپس ۷۰ میکروگرم پروتئین با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۰ درصد SDS-پلی آکریل آمید جدا شده و سپس بر روی غشای فلوراید پلی وینیلیدن منتقل گردید (Pall Corporation؛ Port Washington؛ NY: US). در مرحله بعد، بلوکه سازی به مدت یک ساعت با شیر ۵ درصد در سالیین بافرتریس با توین ۲۰ انجام شد. آنتی بادی‌های اولیه با رقت ۱ به ۴۰۰ (anti-COX-2، anti-VEGF، anti-HIF-1 α ، anti-bFGF) محصول شرکت Boshide Biotechnology Co. اضافه شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شد. سپس آنتی بادی ثانویه (۱ به ۵۰۰۰) اضافه شد و برای مشاهده باند از واکنش کمی لومینسانس استفاده شد. از سیستم تصویربرداری ChemiDocMP (Bio-Rad, USA) برای سنجش شدت نوارهای پروتئینی استفاده کردیم و با شدت باند GAPDH در هر ژل نرمال شد.

آنالیز آماری: مقادیر زیستایی سلول‌ها با روش ANOVA یک طرفه مقایسه شد. سطوح بیان ژن با استفاده از آزمون Benjamini و Kruskal-Wallis H مقایسه شد. از نرخ کشف کاذب هوشبرگ برای تصحیح نتایج استفاده شد. (STATA 14.2 (TX USA) و یک بسته نرم افزاری آماری گراف پد پریم ۶ (CA: USA) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در نهایت، معناداری مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

Apochromat 100 استفاده شد. برای تعیین کمیت سطح خراش، از نرم افزار ImageJ استفاده شد.

qRT-PCR: در یک پلیت شش‌خانه، سلول‌های HepG2 (1×10^6 سلول) کشت داده شد. پس از آن سلول‌ها تیمار شده و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای استخراج RNA، از یک RNeasy Mini-Kit (Qiagen؛ Hilden؛ آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در مرحله بعد، خلوص RNA و همچنین محتوای آن با طیف سنجی بررسی شد (NanoDrop 2000؛ آلمان). علاوه بر این، سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت فرمانتاز سنتز شد (Fermentas؛ Maryland: USA). جهت انجام RT-PCR از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). qRT-PCR روی سیستم (Roche Molecular Systems: USA) با استفاده از SYBR Premix Ex Taq (Qiagen, USA) انجام شد. به منظور نرمال سازی سی تی ژن‌های مورد بررسی از ژن خانه دار GAPDH استفاده شد (۷، ۸). سطوح نسبی بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با کمک ابزار آنالیز داده‌های آنالیز QIAGEN محاسبه شد.

وسترن بلات: در یک پلیت شش‌خانه حدود 1×10^6 سلول HepG2 کشت داده شد. متعاقباً، سلول‌ها با گروه‌های مورد مطالعه تیمار شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید.

جدول ۱- پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه

ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت
ZEB1	5' GCACCTGAAGAGGACCAGAG 3'	5' TGCATCTGGTGTTCATTTT 3'
VEGF	5' CTGAAGAGGACCAGA 3'	5' TCCTTCTGCACACATTTGA 3'
Twist	5' GACGGTTCGCCATCCAGAC 3'	5' TGTCCATTTTCTCCTTCTCTGGA 3'
cyclin D1	5' GCTGCGAAGTGGAACCATC 3'	5' GCTGCGAAGTGGAACCATC 3'

نتایج

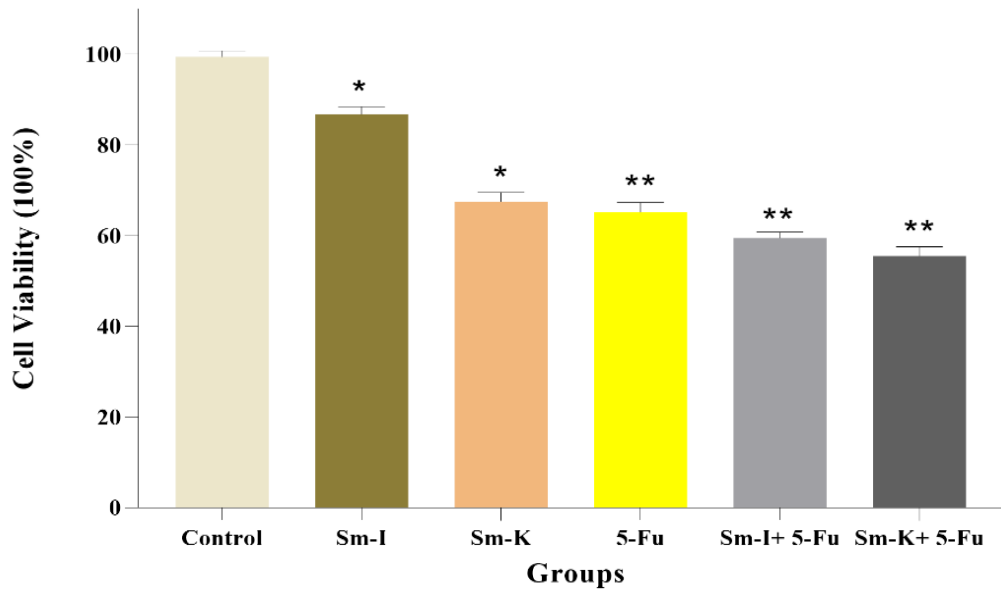
علاوه بر این، سطح بیان ژن VEGF که در رگ زایی نقش دارد در تمام گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است و در گروه‌های ترکیبی Sm-I+5-FU و Sm-K+5-FU در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب $3/87$ برابر و $3/46$ برابر کاهش یافته است. سطح بیان چهار پروتئین مرتبط با رگ‌زایی (VEGF، HIF-1 α ، bFGF و COX-2)، مرتبط با اتوفاژی (Beclin1، LC3-I و LC3-II)، مرتبط با آپوپتوز (کاسپاز ۸، Bax و Bcl-2) و NF-kB با استفاده از روش وسترن بلات سنجیده شد و بدین منظور از میانگین غلظت GAPDH به عنوان پروتئین خانه‌دار جهت نرمال سازی نتایج وسترن بلات استفاده شد. همانطوریکه در شکل ۵ نیز قابل مشاهده است در تمام گروه‌های تیمار شده سطح پروتئین‌های مورد بررسی به طور معنی داری کاهش یافته است. همچنین، بیشترین غلظت پروتئین کاهش یافته در مقایسه با گروه کنترل مربوط به پروتئین VEGF در گروه Sm-I+5-FU مشاهده گردید (مقدار پی کمتر از ۰/۰۰۱). علاوه بر این، در گروه‌های ترکیبی میانگین غلظت تمام پروتئین‌ها به طور معنی داری کمتر از گروه‌های Sm-I و Sm-K بوده است که نشان دهنده این مطلب است که ترکیب سیلیبیوم ماریانوم و 5-FU اثر بخشی بیشتری در مقایسه با Sm-I یا Sm-K تنها دارد. علاوه بر این، همانطوریکه در شکل ۶ نیز قابل مشاهده است. اسانس به تنهایی باعث افزایش اندک اما معناداری در سطح پروتئین می‌شود، 5-FU به تنهایی افزایش بیشتری را ایجاد می‌کند، در حالی که ترکیبات اسانس به علاوه 5-FU قوی‌ترین افزایش را ایجاد می‌کند. شکل ۷ مجموعه‌ای از بلات‌ها و شکل 7B نمودارهای کمی فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز را نشان می‌دهد. اسانس Sm-I و Sm-K به تنهایی باعث افزایش اندک اما قابل توجهی

سیلیبیوم ماریانوم و 5-FU به طور معنی داری منجر به کاهش زیستایی، مهاجرت سلول‌های HepG2 شد. تکثیر و زیستایی و همچنین مهاجرت سلول‌های HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها در شکل ۱ تا ۳ نشان داده شده است. همه تیمارها باعث کاهش قابل توجهی در زیستایی و مهاجرت سلول‌ها شدند. غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I، غلظت ۱۹/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU، غلظت ۱۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، همراه ۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU و همچنین غلظت ۲۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I همراه ۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در زیستایی و مهاجرت سلول‌های HepG2 در مقایسه با گروه کنترل گردید. برای اطلاعات بیشتر به اشکال ۱ الی ۳ مراجعه شود. در گروه‌های تیمار شده (با غلظت‌هایی که در بالا اشاره شد) بعد از انکوباسیون ۶ ساعته میزان مهاجرت سلولی بین ۳۲ تا ۶۰ درصد کاهش یافته است. همچنین، پس از انکوباسیون ۱۲ ساعته، مهاجرت بین ۲۲ تا ۳۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳). در گروه‌های تیمار شده میانگین سطح بیان VEGF، NF-kB و فاکتورهای درگیر در مسیر پیام‌رسانی Wnt، آنژیوژنز، آپوپتوز، اتوفاژی و به طور معنی داری در مقایسه با کنترل تغییر بیان داشته است. سطوح بیان ژن‌های سایکلین D1، VEGF، ZEB1 و Twist با استفاده از RT-PCR اندازه‌گیری شد. نتایج ارائه شده در شکل ۴ نشان داد که سطح بیان ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی Wnt از قبیل ژن‌های سایکلین D1، ZEB1 و Twist در تمام گروه‌های تیمار شده به طور معنی داری کاهش یافته است. بیشترین کاهش بیان در مورد ژن Twist می‌باشد که سطح بیان این ژن در گروه Sm-I+5-FU در مقایسه با گروه کنترل $3/18$ برابر کاهش یافته است.

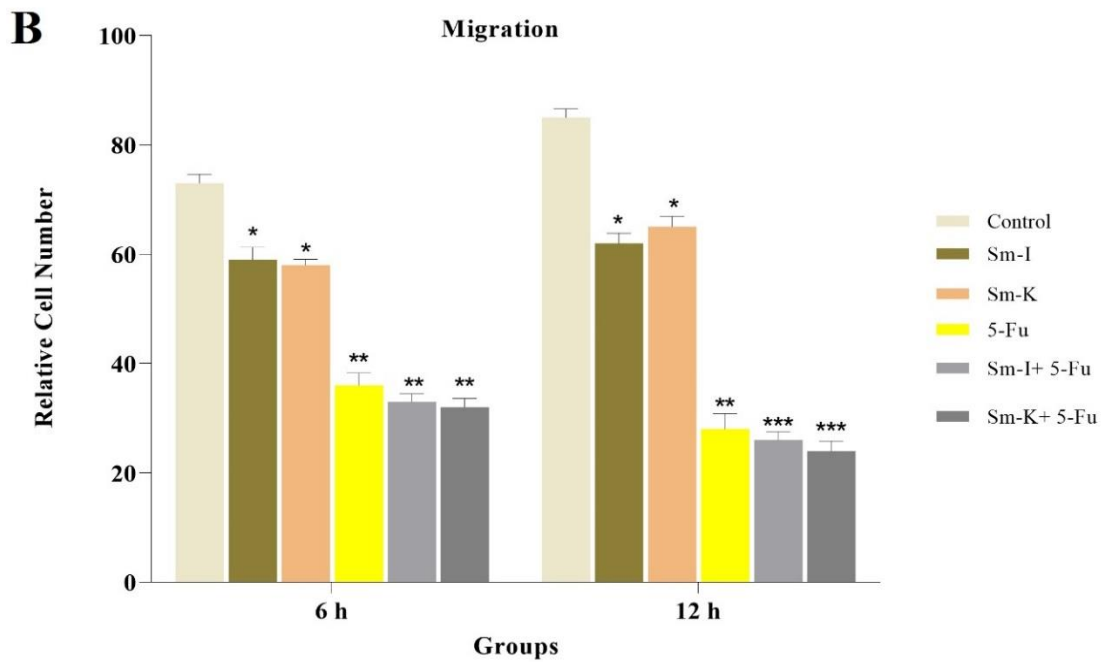
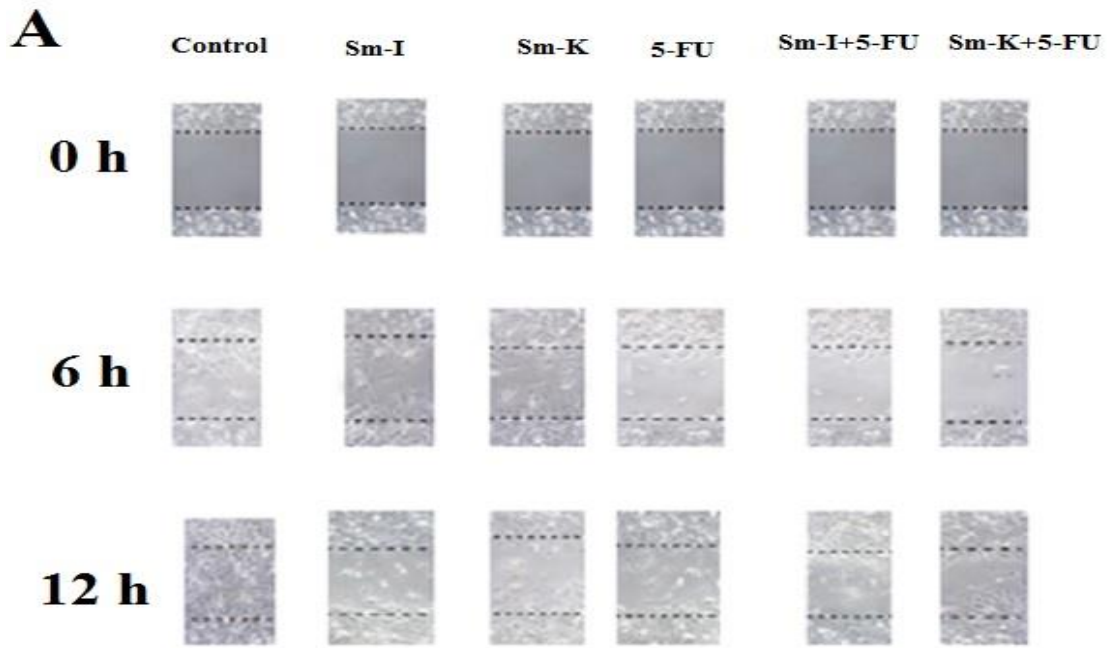
تنهایی باعث کاهش کوچک اما معناداری در پروتئین های (p65) phospho-NF- κ B و NF- κ B (p65) شد؛ 5-FU به تنهایی کاهش بیشتری را ایجاد کرد، در حالی که ترکیبات اسانس به علاوه 5-FU قوی ترین کاهش را ایجاد کردند.

در سطح پروتئین های آپوپتوزی (کاسپاز-۸ و Bcl2) شد و سطح پروتئین ضدآپوپتوز (Bax) را به میزان معناداری کاهش داد. 5-FU به تنهایی کاهش بیشتری را ایجاد می‌کند، در حالی که ترکیب اسانس به علاوه 5-FU بیشترین کاهش و افزایش را ایجاد کرد. همانطوریکه در شکل ۸ قابل مشاهده است اسانس به

MTT

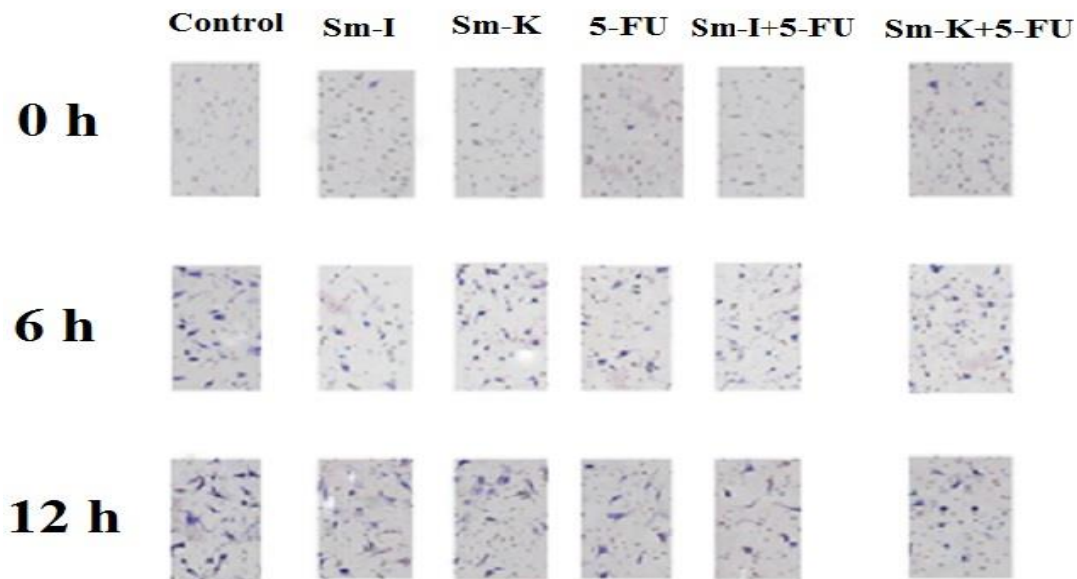


شکل ۱- زنده‌مانی سلول. سلول‌های HepG2 به مدت ۴۸ ساعت با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I، غلظت ۱۹/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU، غلظت ۱۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K همراه ۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU و همچنین غلظت ۲۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I همراه ۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU تیمار شدند. (کنترل گروه تیمار نشده). *: $p < 0/05$ ، **: $p < 0/01$

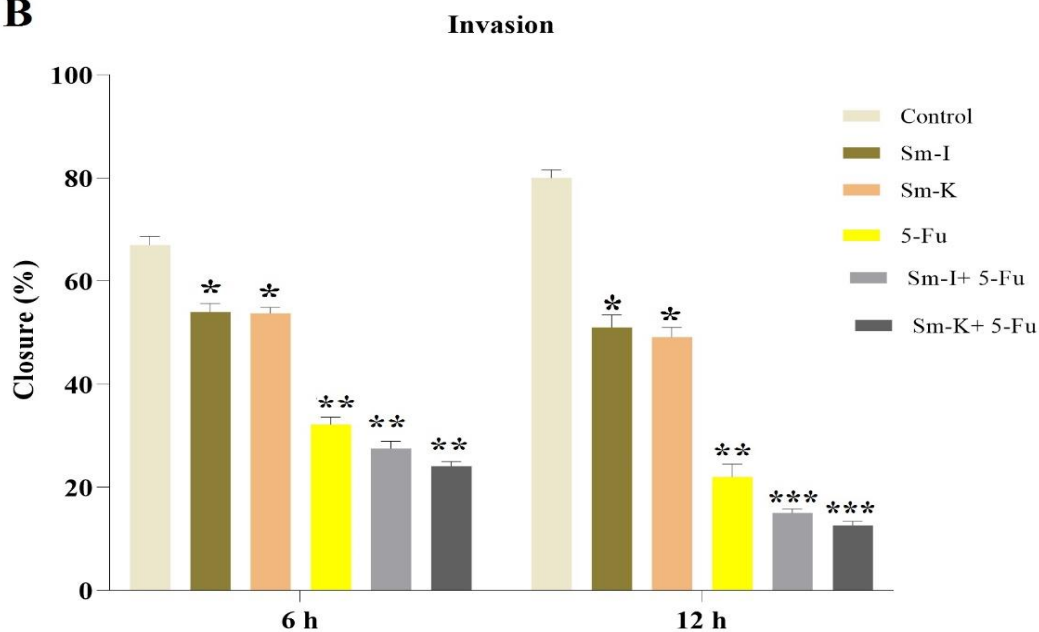


شکل ۲- مهاجرت سلولی. سلول‌های HepG2 در محفظه Boyden اصلاح شده با Matrigel با کنترل (تیمار نشده)، و غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I، غلظت ۱۹/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU، غلظت ۱۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K به‌مراه ۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU و همچنین غلظت ۲۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I به‌مراه ۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU. پس از ۶ و ۱۲ ساعت، تعداد سلول‌های مهاجم به شیوه ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها اندازه‌گیری شد. A: تصویر نماینده و B: اندازه‌گیری شده. * $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$.

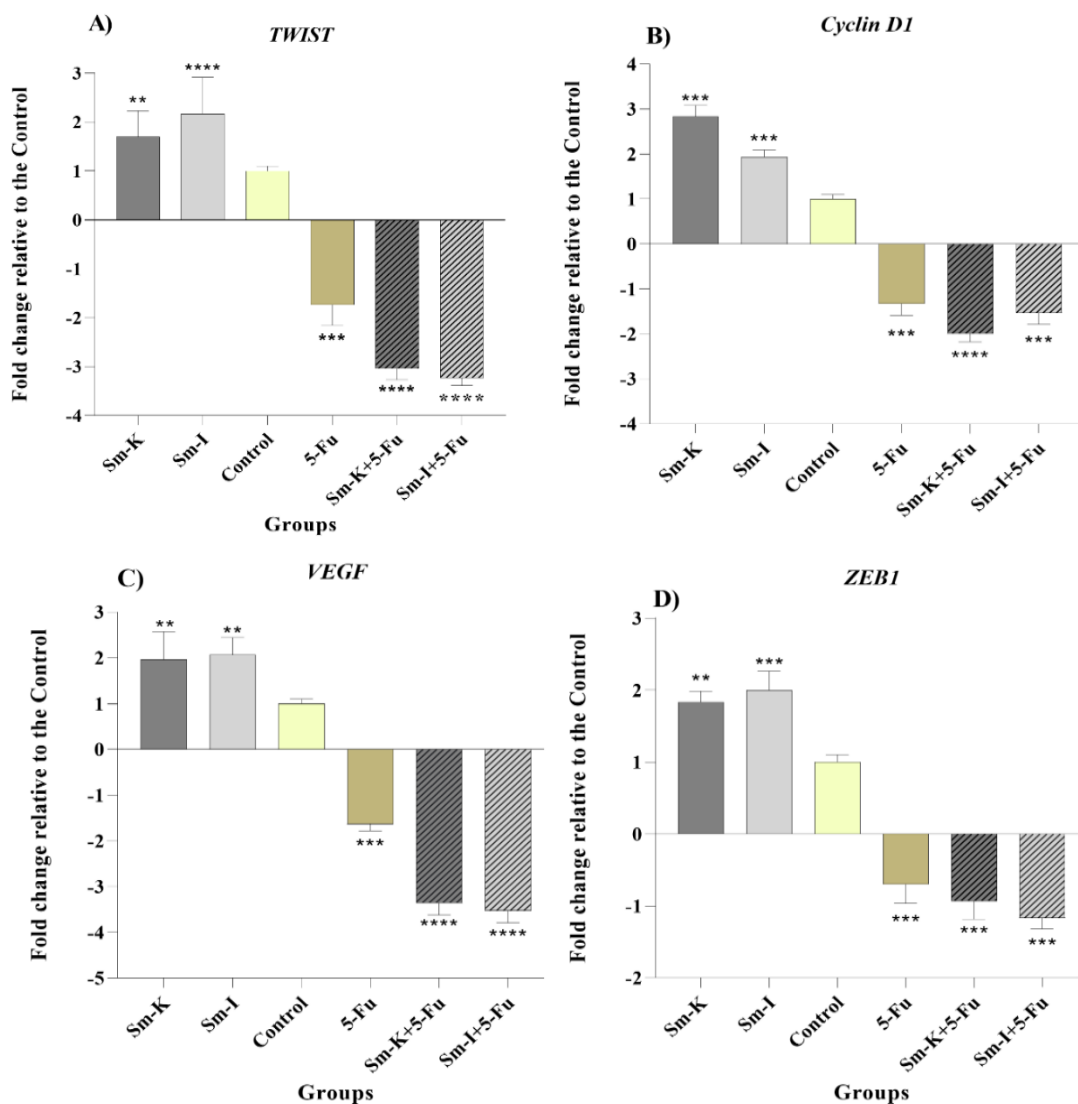
A



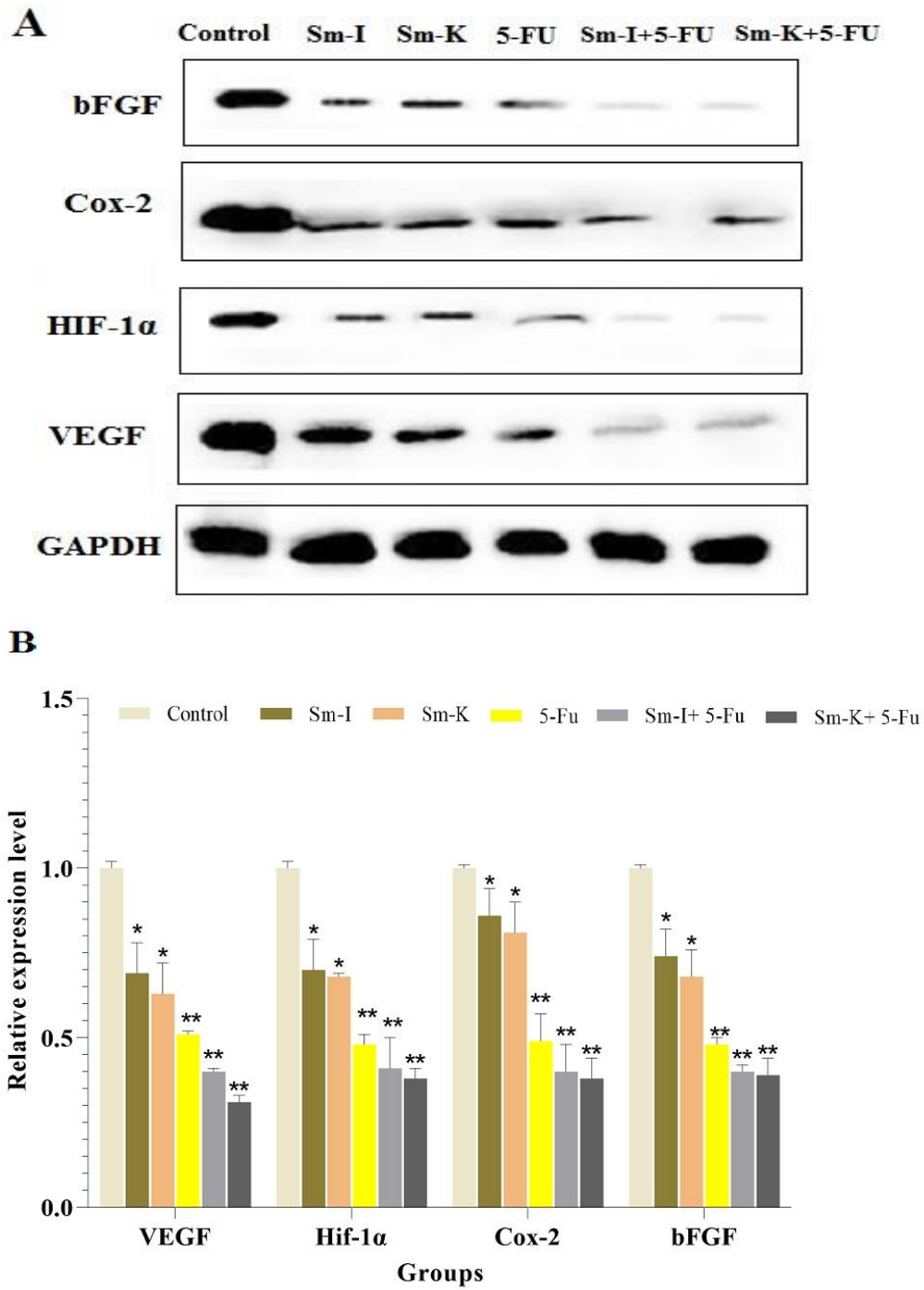
B



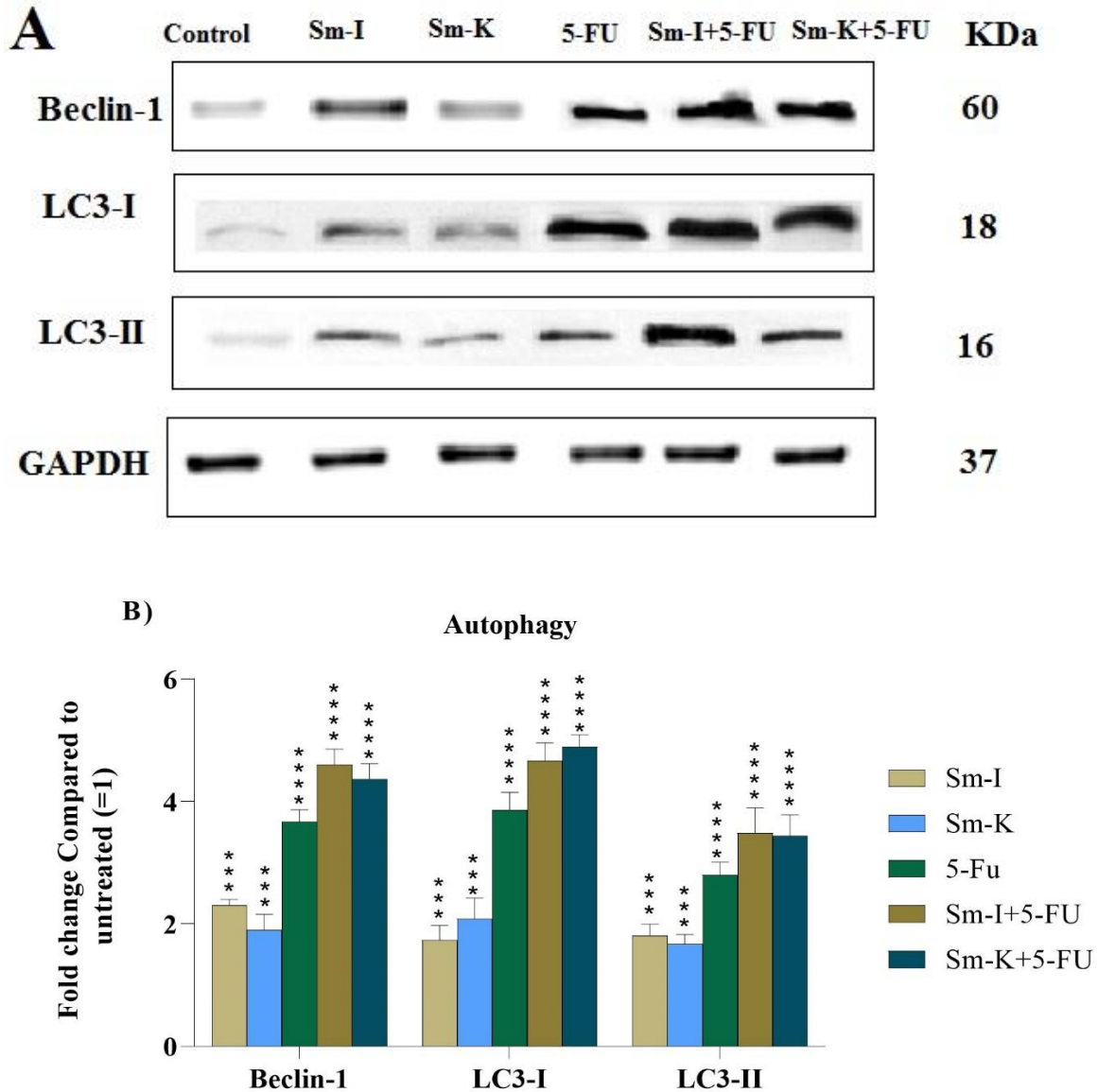
شکل ۳- مهاجم سلولی (درصد بسته شدن خراش). سلول‌های HepG2 در محل تلاقی ۸۰٪ با نوک پیپت خراشیده شده و با کنترل (تیمار نشده)، و غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I، غلظت ۱۹/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU، غلظت ۱۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-K، همراه ۱۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU و همچنین غلظت ۲۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از Sm-I همراه ۹ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از 5-FU. پس از ۶ و ۱۲ ساعت، تعداد سلول‌های مهاجم به شیوه ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها اندازه‌گیری شد. A: تصویر نماینده و B: اندازه‌گیری شده. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.



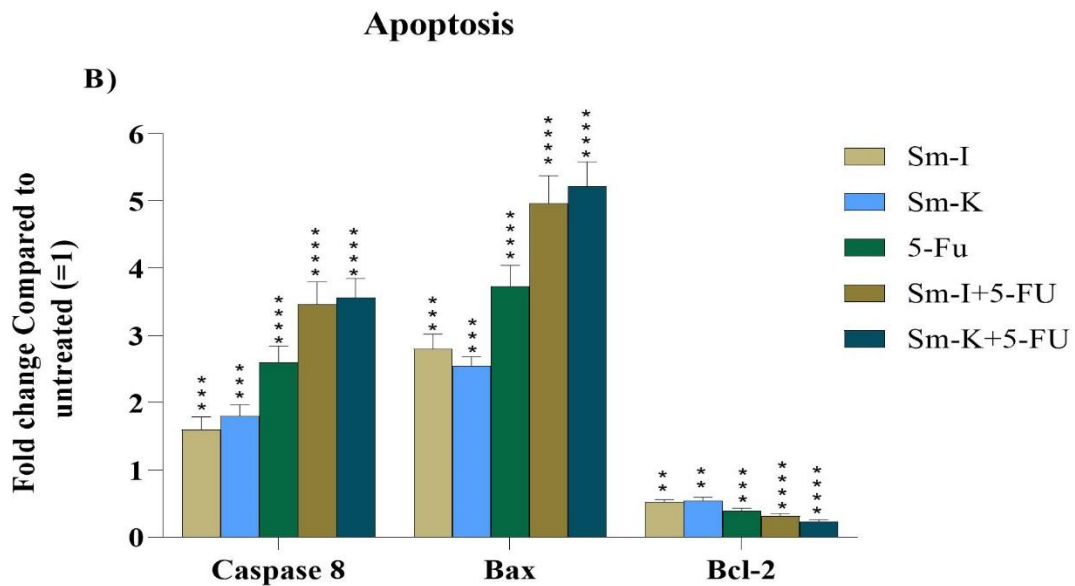
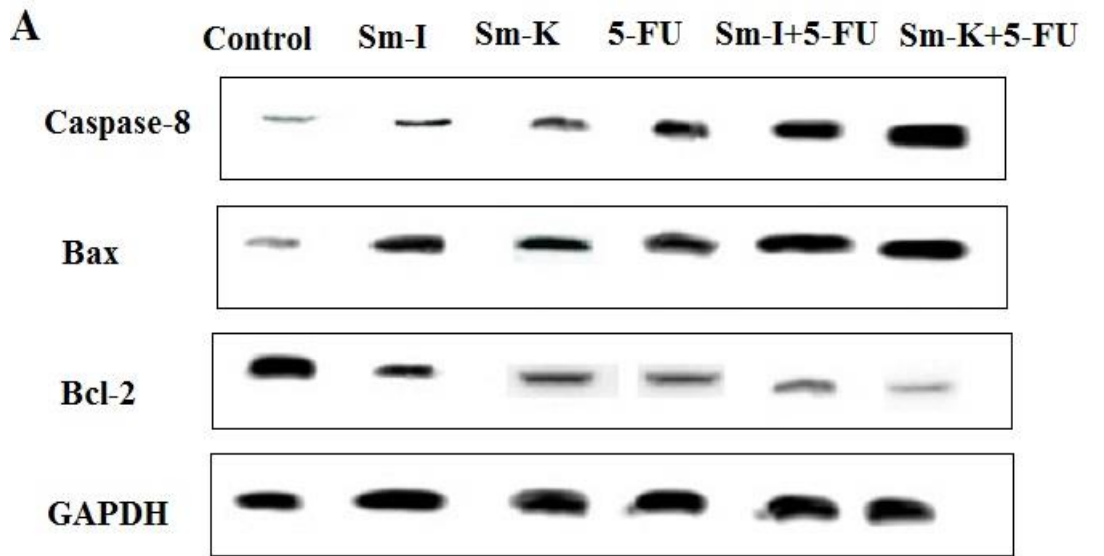
شکل ۴. مقایسه سطح بیان ژن های سایکلین D1، VEGF، Twist و ZEB1 بین گروه های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل (تیمار نشده). *: $p < 0/05$; **: $p < 0/01$; ***: $p < 0/001$; ****: $p < 0/0001$



شکل ۵. وسترن بلات (باند های وسترن بلات شکل A) و سنجش پروتئین های مربوط به رگ زائی (شکل B) در گروه های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل (تیمار نشده). *: $p < 0/05$; **: $p < 0/01$; ***: $p < 0/001$; ****: $p < 0/0001$; *****: $p < 0/00001$

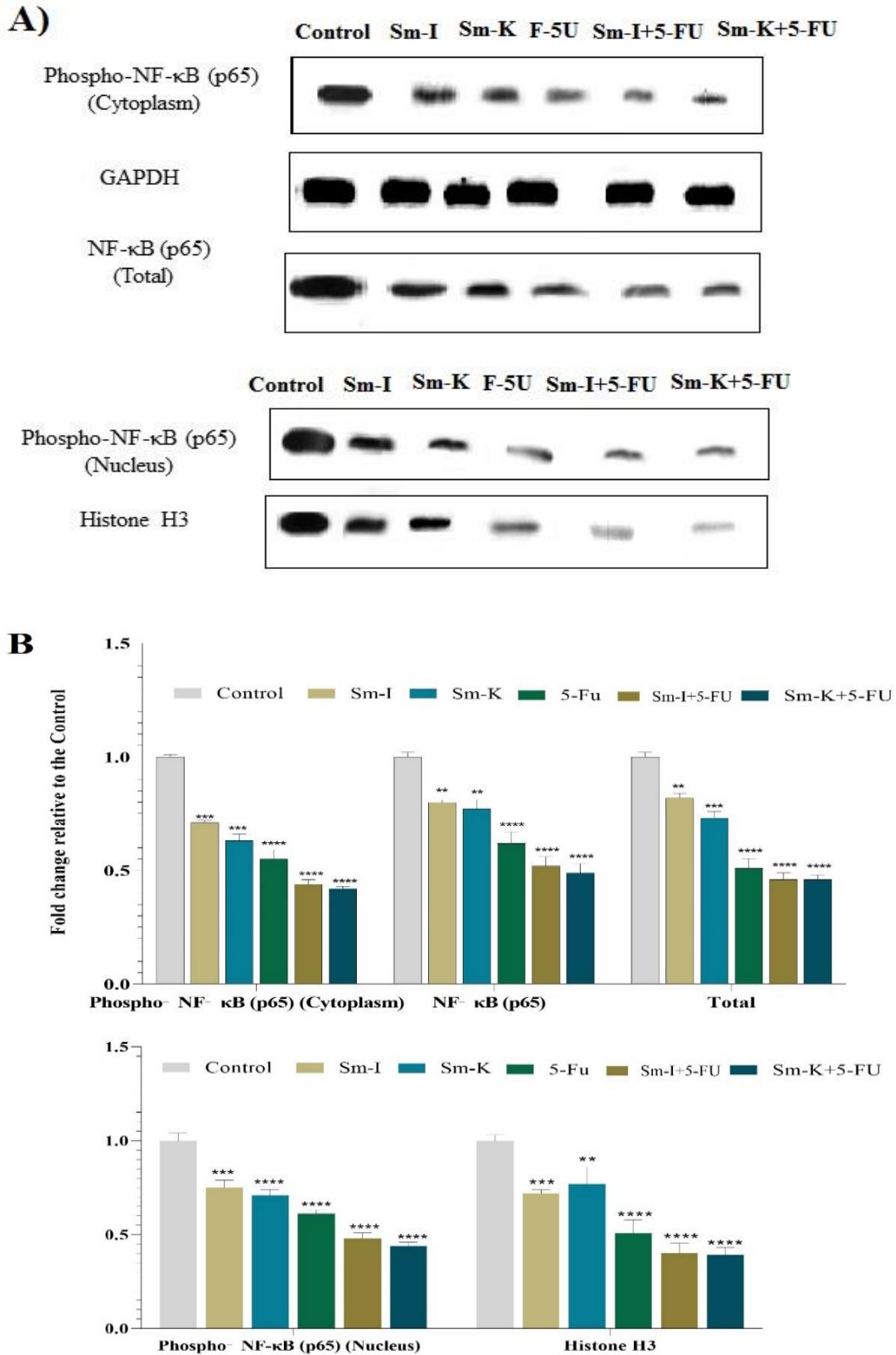


شکل ۶. وسترن بلات (باندهای وسترن بلات شکل A) و سنجش پروتئین‌های مربوط به اتوفاژی (شکل B) در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل (تیمار نشده). *: $p < 0/05$, **: $p < 0/01$, ***: $p < 0/001$ و ****: $p < 0/0001$



شکل ۷. وسترن بلات (باند‌های وسترن بلات شکل A) و سنجش پروتئین‌های مربوط به اتوفازی (شکل B) در گروه‌های تیمار

شده در مقایسه با گروه کنترل (تیمار نشده). **: $p < 0/01$; ***: $p < 0/001$; ****: $p < 0/0001$



شکل ۸. سطوح پروتئین‌های مرتبط با NF-κB (total NF-κB (p65) و phospho-NF-κB (p65)) با استفاده از وسترن بلات. تیمار سلول‌های HepG2 با کنترل (بدون دارو) و گروه‌های تیمار شده که به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

بحث

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. طبق نتایج، میانگین همه فاکتورهای مورد بررسی در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه تیمار نشده به طور معنی داری کاهش یافته است. با این حال نتایج بدست آمده نیازمند مطالعات تجربی بیشتری است. اخیراً، وو و همکارانش از یک رده سلولی کارسینومای انتقالی T24-L متاستاتیک استفاده کردند و نتیجه گرفتند که تیمار با سیلیبین می‌تواند از تهاجم و مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند، متاستاز ریه را در سرطان مثانه کاهش دهد و بقای حیوانات را در شرایط درون تنی افزایش دهد (۴۳). به طور مشابه، کوفی و همکارانش توانایی سیلیبین در کاهش بیان عوامل رونویسی مرتبط با EMT SNAIL2 و TWIST1 در رده سلولی سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک با جهش EGFR را نیز نشان دادند (۱۰). آنژیوژنز یا رگ‌زایی نقش مهمی در رشد سرطان ایفا می‌کند، زیرا تومورهای جامد در صورتی که اندازه آنها بیش از چند میلی متر باشد نیاز به خون دارند. تومورها در واقع می‌توانند با انتشار سیگنال‌های شیمیایی که رگ‌زایی را تحریک می‌کنند، باعث ایجاد این منبع خون شوند (۲). آنژیوژنز یک مکانیسم مهم در پیشرفت و توسعه HCC است که اغلب در تومورهای بسیار پرعروق مشاهده می‌شود (۴۶، ۳۱، ۳۳). از فاکتورهای بسیار مهمی که منجر به تحریک رگ‌زایی می‌شود می‌توان به HIF-1 α ، VEGF، bFGF و Cox-2 اشاره کرد (۱۳، ۲۱، ۲۸-۲۹، ۳۱، ۳۶، ۴۲-۴۴). در مطالعات مختلفی اثر مهار کنندگی سیلیبین ماریانوم بر روی رگ‌زایی مورد بحث قرار گرفته است. به عنوان مثال، دیپ و همکارانش قدرت مهار رگ‌زایی را بین چهار فلاونولیگنان دیاستروایزومر خالص، از جمله ایزوسیلیبین B، ایزوسیلیبین A، سیلیبین A، سیلیبین B انجام مورد مقایسه قرار دادند.

در این مطالعه اثرات ضدتوموری اسانس سیلیبین ماریانوم را به صورت تک درمانی یا در ترکیب با 5-FU در سلول‌های HepG2 ارزیابی گردید. مطالعه حاضر نشان داد که اسانس سیلیبین ماریانوم به تنهایی و در ترکیب با 5-FU اثرات ضد توموری خود را از طریق تأثیر بر روی مسیرهای انتهایی، Wnt، آپوپتوز، اتوفاژی، رگ‌زایی بر روی رده سلولی HepG2 اعمال می‌کند. مطالعات ما نشان داد که سیلیبین ماریانوم به تنهایی و در ترکیب با 5-FU قادر به کاهش بیان ژن‌های مرتبط با پیام‌رسانی Wnt مانند ZEB1، Twist و cyclin D1 در سلول‌های HepG2 هستند. مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin نقش حساسی در پاتوژنز کبد ایفا می‌کند (۶، ۸). در این راستا، سیکلین D1 به عنوان یک هدف شناخته شده برای β -catenin فعال شده در نظر گرفته می‌شود (۱۶، ۱۷، ۳۷، ۳۸). متاستاز یک فرایند پیچیده ای است که شامل جدا شدن سلول‌های توموری از محل اولیه و به دنبال آن انتشار و تکثیر در مکانهای دوردست است. برای دستیابی به این هدف، سلول‌های سرطانی اپیتلیال باید یک فنوتیپ مهاجر و انعطاف‌پذیر بدست آورند. انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) یک مکانیسم رشد مهمی است که به سلول‌های تومور اجازه می‌دهد تا به این فنوتیپ دست یابند. شواهد نشان داده است که عوامل تحریک کننده EMT از جمله ZEB1، Twist و سایکلین D1 می‌توانند باعث پیشروی بدخیمی و متاستاز شوند (۱۵، ۳۴، ۳۷-۴۰). گزارش شده است که VEGF علاوه بر اینکه از طریق افزایش رگ‌زایی منجر به پیشرفت بدخیمی می‌شود همچنین از طریق تنظیم محیط توموری منجر به تحریک متاستاز سلول‌های سرطانی نیز می‌شود (۱۴). از این رو، در این مطالعه، سطح بیان پروتئین‌های VEGF، ZEB1، Twist و سایکلین D1 در گروه‌های تیمار شده

ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات تشخیص داده شد. مکمل غذایی سیلیمارین بیان COX-2 را کاهش داده و همچنین لیپید خون را به طور معنی‌داری کاهش داده است. از این رو، ترکیباتی مانند سیلیمارین با اثرات هایپولیپیدمی قوی می‌تواند به عنوان عوامل جایگزین شیمی درمانی در بیماران با خطر بالای سرطان کبد در نظر گرفته شود (۳۵).

در مطالعه حاضر، بیان برخی از ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی برنامه ریزی شده از قبیل آپوپتوز و اتوافازی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که اسانس سیلیبیوم ماریانوم به تنهایی و در ترکیب با 5-FU می‌تواند بیان ژن‌های محرک آپوپتوز (کاسپاز-۸ و Bax) و اتوافازی را در سلول‌های HepG2 افزایش دهد. اتوافازی یکی از عملکردهای مهم بیولوژیکی است و تنظیم آن در بیماری‌زایی سرطان کبد نقش دارد (۱۱). اختلال در تنظیم اتوافازی با اختلال در تعادل انرژی و مواد مغذی در سلول‌ها همراه است و بنابراین بر فیزیولوژی کبد و بیماری کبد تأثیر می‌گذارد (۱۱). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که سیلیمارین قادر است از طریق هدف قرار دادن پروتئین‌های مرتبط با اتوافازی، اثرات ضدسرطانی داشته باشد. جیانگ و همکارانش اثرات ضدسرطان سیلیبینین را ارزیابی کردند. آنها نشان دادند که این ترکیب تأثیر خود را از طریق هدف قرار دادن پروتئین‌های مرتبط با اتوافازی مانند LC3-I و LC3-II اعمال می‌کند (۱۸). نتایج آنها نشان داد که سیلیبینین باعث تبدیل LC3-I به LC3-II، و در نتیجه باعث افزایش شدید Atg12-Atg5 می‌شود. این رویدادها منجر به بیان بیش از حد بکلین-۱ و کاهش سطح Bcl-2 می‌شود و بدین طریق مرگ سلولی ناشی از اتوافازی را تحریک می‌کند (۴۳). مشابه مطالعه ما، برخی مطالعات تأیید کردند که سیلیمارین می‌تواند

این ترکیبات به عنوان اجزای بیولوژیکی فعال در اسانس سیلیبیوم ماریانوم شناخته شده‌اند (۱۲).

محققان دریافتند تغذیه موش‌ها با فلاونولینگنان (۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) با مهار موثر رشد تومور ارتباط دارد. آنالیز ایمونوهیستوشیمی نشان داد که چنین فلاونولینگن‌هایی می‌توانند بیومارکرهای آنژیوژنز تومور مانند نستین و CD31 و همچنین واسطه‌های پیام رسانی (VEGFR1، VEGF، HIF-1 α ، phospho-Akt و VEGFR2) را کاهش دهند تا رگ‌زایی را تنظیم کنند. همچنین فلاونولینگنان‌ها می‌توانند تشکیل لوله شبه مویرگی القا شده توسط VEGF، تکثیر سلولی و همچنین تهاجم سلول‌های اندوتلیال وریدی ناف انسان (HUVEC) را به صورت *in-vitro* مهار کنند. تحقیقات بعدی با استفاده از HUVEC نشان داد که فلاونولینگنان‌ها می‌توانند چرخه سلولی را متوقف کرده، مسیرهای پیام رسانی ناشی از VEGF را مهار کرده و باعث آپوپتوز شوند (۱۲). علاوه بر این، جیانگ و همکارانش نقش سیلیمارین را به عنوان یک عامل ضد رگ‌زایی در HUVECs و سمیت سلولی آن در سلول‌های سرطانی پستان و پروستات انسان ارزیابی کردند. آنها مشاهده کردند که تنها پس از گذشت یک ساعت، سیلیمارین می‌تواند بر ترشح VEGF تأثیر مهاری داشته باشد. آنها به این نتیجه رسیدند که سیلیمارین یک اثر ضد رگ‌زایی نشان می‌دهد که می‌تواند اثر پیشگیرانه آن بر گسترش سرطان را توضیح دهد (۱۷). در نهایت، راماکریشان و همکارانش تأثیر مکمل‌های غذایی با سیلیمارین را در مدل رت کارسینوز کبدی ناشی از N-نیتروسودیل اتیل‌آمین بررسی کردند. آنها بیان COX-2، پروفایل لیپیدی، آنزیم‌های متابولیزه کننده لیپید و اسیدهای چرب آزاد را در رت‌ها اندازه‌گیری کردند (۳۵). موش‌های تیمار شده با NDEA افزایش بیان COX-2 و هایپرلیپیدمی شدید را نشان دادند که توسط

اثرات ضدالتهابی سیلیمارین از طریق مهار فعال سازی NF- κ B و انواع کینازها، مشاهده شده است (۲۶).

نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد که اسانس سیلیبیوم ماراینوم به تنهایی و در ترکیب با 5-FU قادر به تنظیم مسیرهای مختلف سلولی مرتبط با سرطان‌زایی در سلول‌های HepG2 می باشد. به نظر می‌رسد که استفاده از اسانس سیلیبیوم ماراینوم ممکن است اثرات ضدسرطانی داروهای خط اول در درمان سرطان سلول‌های کبدی یعنی 5-FU را بهبود بخشد. با اینحال، تحقیقات پیش بالینی و بالینی بیشتر برای تأیید اثرات ضد سرطان سلول‌های کبدی انسانی مورد نیاز است.

منابع

1. Abdalla M.A., Ali N.A., Zoheir Kh M.A. 2017. Moringa oleifera Root Induces Cancer Apoptosis More Effectively than Leave Nanocomposites and Its Free Counterpart. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 1(8): 2141-2149.
2. Ambs S., Merriam W.G., Bennett W.P., Felley-Bosco E., Ogunfusika M.O., Harris C.C. 1998. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Research*. 58(2): 334-41.
3. Balogh J., Victor D., Asham E.H., Burroughs Sh., Boktour M., Monsour H P. 2016. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 3: 41-53.
4. Bava S.V., Vineshkumar T., Anto R.J. 2005. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor- κ B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*. 280(8): p. 6301-6308.

آپوپتوز را در سرطان‌های مختلف مانند سلول‌های سرطانی معده افزایش دهد (۱، ۱۹).

همانطور که قبلاً ذکر شد، بیان برخی از ژن‌های مرتبط با NF- κ B در پژوهش ما مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که اسانس سیلیبیوم ماراینوم به تنهایی و در ترکیب با 5-FU قادر به کاهش بیان total phospho-NF- κ B (p65) و NF κ B (p65) در سطح پروتئین در سلول‌های HepG2 می‌باشند. در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سلول‌های کبدی التهاب مزمن نقش بسیار مهمی را بازی می‌کند و از طریق تحریک بسیاری از مسیرها می‌تواند در پیشرفت تومور کمک کننده باشد. یکی از فاکتورهای بسیار مهمی که رابط بین سرطان و التهاب است NF- κ B می‌باشد و از طریق القاء تکثیر و جلوگیری از آپوپتوز نقش مهمی در پیشرفت سرطان کبد ایفا می‌کند (۱۶). مانا و همکارانش در مطالعه ای تاثیر سیلیمارین بر فعال شدن NF- κ B را که توسط عوامل مختلف التهابی ایجاد شده بود، ارزیابی کردند (۲۶). آنها نشان دادند که سیلیمارین می‌تواند فعال شدن NF- κ B ناشی از TNF را به صورت وابسته به زمان و دوز مهار کند. فسفوریلاسیون و تجزیه Total kappa B alpha که به عنوان مهار کننده NF- κ B عمل می‌کند منجر به این اثرات می‌شود. علاوه بر این، نشان داده شده است که انتقال p65 به هسته بدون تأثیر بر توانایی‌های مربوط به اتصال به DNA توسط سیلیمارین مهار می‌گردد. رونویسی ژن گزارشگر وابسته به NF- κ B را می‌توان با سیلیمارین مهار کرد. محققان نشان دادند که فعال سازی NF- κ B که توسط عواملی مانند LPS، فوربول استر، سرامید، اوکادائیک اسید صورت می‌گیرد می‌تواند توسط سیلیمارین مهار شود. تأثیرات سیلیمارین بر فعال شدن NF- κ B اختصاصی است زیرا فعال شدن AP-1 متاثر نشده است. از این رو،

13. Fukuda K., Taniguchi H., Koh T., Kunishima S., Yamagishi H. 2004. Relationships between oxygen and glucose metabolism in human liver tumours: positron emission tomography using (15)O and (18)F-deoxyglucose. *Nuclear Medicine Communications*. 25(6): 577-83.
14. Gallo D., Giacomelli S., Ferlini C., Raspaglio G., Apollonio P., Prislei C., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Scambia G. 2003. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. *Eur J Cancer*,. 39(16): 2403-2410.
15. Guarino, M., Rubino B., Ballabio G. 2003. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *European Journal of Cancer*. 39(3): 305-18.
16. He M., Zhang W., Dong Y., Wang L., Fang T., Tang W., Lv B., Chen G., Yang B., Huang P., Xia J. 2017. Pro-inflammation NF- κ B signaling triggers a positive feedback via enhancing cholesterol accumulation in liver cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 36(1):.15.
17. Jiang C., Agarwal R., Lü J. 2000. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276(1): 371-8.
18. Jiang K., Wang W., Jin X., Wang Zh., Ji Zh., Meng G. 2015. Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells. *Oncology Reports*. 33(6): 2711-2718.
19. Kauntz H., Bousserouel S., Gosse F., Marescaux J., Raul F. 2012. Silibinin, a natural flavonoid, modulates the early expression of chemoprevention biomarkers in a preclinical model of colon carcinogenesis. *International Journal of Oncology*. 41(3): 849-54.
5. Aykanat N.E., Kacar S., Karakaya S., Shahinturk V. 2020. Silymarin suppresses HepG2 hepatocarcinoma cell progression through downregulation of Slit-2/Robo-1 pathway. *Pharmacological Reports*. 72(1): 199-207.
6. Cadigan, K.M. 2002. Wnt signaling--20 years and counting. *Trends in Genetics*. 18(7): p. 340-2.
7. Chuang S., Yeh P.P., Lu Y.S., Lai G.M., Liao C.M., Gao M., Cheng A.L. 2002. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochemical pharmacology*, 63(9): 1709-1716.
8. Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. 127(3): 469-480.
9. Ally A, Laird P.W. 2017. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 169(7): 1327-1341.
10. Cufí S., Bonavia R., Vazquez-Martin A., Corominas-Faja B., Micol V., Menendez J.A. 2013. Silibinin meglumine, a water-soluble form of milk thistle silymarin, is an orally active anti-cancer agent that impedes the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in EGFR-mutant non-small-cell lung carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 60: 360-368.
11. Cui, J., Gong Z., Shen H.M. 2013. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1836(1): 15-26.
12. Deep G., Gangar S.C., Rajamanickam S., Raina K., Gu M., Agarwal C., Oberlies N.H., Agarwal R. 2012. Angiopreventive efficacy of pure flavonolignans from milk thistle extract against prostate cancer: targeting VEGF-VEGFR signaling. *PLoS One*. 7(4): e34630.

- British Journal of Radiology*. 87(1035): 20130676.
29. Mekuria A., Abdi A. 2017. Potential molecular targets and drugs for treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Science and Therapy*. 9: 736-45.
30. Mohammadi-Bardbori, A., Nejati M., Esmaeili J., Ghafari H., Ghazi-Khansari M. 2008. Comparative measurement of in vitro paraquat and aflatoxin B1 cytotoxicity using three different cytotoxicity assays in pheochromocytoma cells (PC-12). *Toxicology Mechanisms and Methods*. 18(9): 685-689.
31. Shirabe K., Sugimachi K., Maehara Y. 2015. Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 45(1): 1-9.
32. Öztürk B., Kocaoğlu E.H., Durak Z.E. 2015. Effects of aqueous extract from *Silybum marianum* on adenosine deaminase activity in cancerous and noncancerous human gastric and colon tissues. *Pharmacognosy Magazine*. 11(41): 143-146.
33. Pang R. Poon R.T. 2006. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 242(2): 151-67.
34. Patil M.A., Lee S.A., Macias E., Lam E.T., Chen X. 2009. Role of cyclin D1 as a mediator of c-Met- and beta-catenin-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*. 69(1): 253-261.
35. Ramakrishnan G., Elinos-Báez C.M., Jagan S., Augustine TA., Kamaraj S., Anandakumar P., Devaki T. 2008. Silymarin downregulates COX-2 expression and attenuates hyperlipidemia during NDEA-induced rat hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 313(1-2): 53-61.
36. Riedl C.C., Brader P., Zanzonico P B., Chun Y Sh., Fong Y. 2008. Imaging hypoxia in orthotopic rat liver tumors with iodine 124-labeled iodoazomycin
20. Khalaf A.M., Fuentes D., Morshid A.I., Burke M.R., Kaseb A.O., Hassan M., Hazle J.D., Elsayes K.M. 2018. Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. 5: 61-73.
21. Kim K.R., Moon H.E., Kim K.W. 2002. Hypoxia-induced angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of molecular medicine*. 80(11): 703-714.
22. Li L.Y., Xu T. 2019. ZEB1 regulates the activation of hepatic stellate cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 865: 172787.
23. Liu K., Min X., Peng J., Yang K., Yang L., Zhang X. 2016. The Changes of HIF-1 α and VEGF Expression After TACE in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine Research*, 8(4): 297-302.
24. Liu L., Xie S., Chen Y., Xue J., Zhang C., Zhu F. 2016. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 22(33): 7486-99.
25. Lu L., Shao Y., Lee Y., Hsieh M., Cheng A., Hsu Ch. 2014. β -catenin (CTNNB1) mutations are not associated with prognosis in advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 87(3): 159-66.
26. Manna S.K., Mukhopadhyay A., Van N T., Aggarwal B.B., 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *Journal of Immunology*, 163(12): 6800-6809.
27. Mastron J.K., Siveen K.S., Sethi G., Bishayee A. 2015. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anticancer Drugs*, 26(5): 475-86.
28. McKeown S. 2014. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *The*

42. Williams, C.S., Tsujii M., Reese J., Dey S.K., DuBois R.N. 2000. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *Journal of Clinical Investigation*, 105(11): 1589-94.
43. Wu, K., Wu K., Ning Zh., Zeng J., Fan J., Wang X., He D. 2013. Silibinin inhibits β -catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. *Cell Signaling Technology*, 25(12): 2625-33.
44. Xiong, X.X., Qiu X.Y., Hu D.X., Chen X.Q. 2017., Advances in Hypoxia-Mediated Mechanisms in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Pharmacology*, 92(3): 246-255.
45. Xu T., Guo P., Pi Ch., He Y., Wei Y., Zhao L. 2020. Synergistic Effects of Curcumin and 5-Fluorouracil on the Hepatocellular Carcinoma In vivo and vitro through regulating the expression of COX-2 and NF- κ B. *J Cancer*, 11(13): 3955-3964.
46. Yang, Z.F., Poon R.T. 2008. carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*, 291(6): 721-34.
47. Zhu B., Lin N., Zhang M., Zhu Y., Cheng H., Chen Sh., Ling Y., Pan W., Xu R. 2015. Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis via interleukin-8 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 13: 365.
- galactopyranoside PET. *Radiology*.. 248(2): 561-570.
37. Zhurinsky J., Simcha I, Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*., 96(10): 5522-5527.
38. Tetsu, O. McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726): 422-6.
39. Tsujii, M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5): 705-16.
40. Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. 2001. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut*, 48(1): 87-96.
41. Wang H., Zhang J., Feng W., Zhang S., Liang H., Wang Y., Zheng Q., Li Z. 2007. PIN1 gene overexpression and beta-catenin gene mutation/expression in hepatocellular carcinoma and their significance. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences*, 27(1): 54-7.

Anti-tumor Effects of *Silybum Marianum* Essential Oil and 5-fluorouracil Combination on Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2)

Mohammad Jaber Masoud Khooy¹, Mohammadreza Salehi Salmi², Massoumeh Farasat¹, Hamed Mirzaei^{3*}

1 .Department of Horticulture, Ahvaz Islamic Azad University, Science and Research Branch, Ahvaz, Iran

2 .Visiting Professor, Department of Horticulture, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran and Faculty Member, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvaz, Iran

3 .Visiting Professor, Department of Horticulture, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran and Faculty Member of Biochemistry and Nutrition Research Center in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Abstract

The present study evaluated the efficacy of combining 5-fluorouracil (5-FU) and *Silybum marianum* essential oils to suppress *in vitro* Hepatocellular carcinoma (HCC) growth by influencing the Wnt, NF- κ B, angiogenesis, apoptosis, and autophagy pathways. *Silybum marianum* essential oils were studied alone and in combination with 5-FU in the HepG2 cell-line. The expression of NF- κ B and Wnt signaling pathway genes as well as angiogenesis, apoptosis, and autophagy-associated genes and proteins were evaluated using Western blot and qRT-PCR techniques. Each treatment decreased the viability of HepG2 cells compared to the control group. Moreover, *S. marianum* essential oils from Khuzestan or Isfahan (Sm-K and Sm-I) in combination with 5-FU reduced the migration and invasion of HepG2 cells. Angiogenesis-related proteins *i.e.* VEGF, COX-2, Bfgf, and HIF-1 α were significantly reduced. Apoptosis- and autophagy-related proteins *i.e.* caspase-8, Bax, Bcl-2, Beclin-1, LC3-I, and LC3-II were modulated by each treatment. Each treatment decreased total NF- κ B (p65) and phospho-NF- κ B (p65) at protein levels. Moreover, the expression levels of Wnt pathway-related genes were decreased. Taken together, these findings revealed that *S. marianum*, either alone or in combination with 5-Fu, could exert anti-tumor effects *via* modulating autophagy, apoptosis, angiogenesis, NF- κ B, and Wnt signaling pathways.

Keywords: Angiogenesis; Hepatocellular Carcinoma; *Silybum Marianum* Essential Oil; 5-fluorouracil; Combination Therapy