

ORIGINAL ARTICLE

Inhibitory Effect of Coadministration of Silibinin and CpG-ODN2006 on Metastatic Characteristics (MMP-2 and TLR-9) of Hepatocarcinoma Cell Line

Arezou Rezaei¹,

Farshid Saadat²,

Farnaz Safavifar³,

Azar Berahmeh⁴,

Mohammad Reza Khorramizadeh^{5,6}

¹ Assistance Professor, School of Biology, Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

² Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Guilam University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

³ Research Associate, Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ MSc in Biootechnology, Department of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Professor, Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran Iran

⁶ Professor, Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received April 15, 2018 ; Accepted November 5, 2018)

Abstract

Background and purpose: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a most common liver malignancy and Toll-like receptor-9 (TLR9) is essential for CpG DNA-induced immune responses. The aim of this study was to assess the anti-metastatic effects of combined administration of silibinin and CpG-ODN2006 on human hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line model.

Materials and methods: Inhibitory effects of various concentrations of silibinin and CpG-ODN2006 on HepG-2 cells growth and detection of best dosages for simultaneous usage were assessed by Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method. Expression levels of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP2) and TLR9 genes were analyzed by real-time PCR. Gelatin zymography was used to determine the activity of MMP2.

Results: Inhibitory effect of coadministration of silibinin (100 µM) and CpG-ODN2006 (100 nM) on HepG-2 cells growth was significant ($P<0.05$). Real-Time PCR showed no significant differences in cycle threshold of the genes expression analyses ($P>0.05$).

Conclusion: Low dose CpG administration efficiently customized silibinin impact on hepatic cancer. Low doses of the drugs and activating immune mechanisms are definitely preferred, therefore, the co-administration of these drugs provide a clear vision for the future of combination therapy.

Keywords: silibinin, CpG-oligodeoxynucleotides, MMP2, TLR9, HepG-2

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (171): 1-10 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Reza Khorramizadeh - Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran Iran (E-mail: khoramza@sina.tums.ac.ir)

مطالعه اثرات مهاری تیمار همان سیلیبینین و الیکونوکلئوتید بر بیان ژن های MMP-2 و CpG-ODN در رد سلول های سرطان کبد

آرزو رضایی^۱

فرشید سعادت^۲

فرنار صفوی فر^۳

آذر برهمه^۴

محمد رضا خرمیزاده^۵

چکیده

سابقه و هدف: هپاتوسسلولار کارسینوما (HCC) سرطانی شایع است و تحریک سیستم ایمنی از طریق TLR-۹ (Toll-like receptors) به وسیله CpG-ODN ۲۰۰۶ می‌تواند در درمان آن کارآیی داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر تیمار همان سیلیبینین و CpG-ODN ۲۰۰۶ بر رشد و تکثیر مدل سلولی HCC می‌باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، اثر بازدارندگی دوزهای متفاوت سیلیبینین و CpG-ODN ۲۰۰۶ بر رشد سلول های HepG2 و تعیین بهترین غلظت برای تیمار همان به روش MTT سنجیده شد. میزان بیان ژن های TLR9 و MMP2 به روش Real-Time PCR سنجیده شد. فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز MMP2 با روش زایموگرافی اندازه گیری گردید.

یافته ها: به ترتیب، غلظت های $100 \mu\text{M}$ و 100nM از سیلیبینین و CpG-ODN ۲۰۰۶ برای انجام تیمار همان انتخاب شدند که اثرات ایستایی شدیدی بر رشد سلول داشتند ($P < 0.05$). نتایج Real-Time PCR تفاوت معنی داری در تکثیر ژن ها نشان نداد ($P > 0.05$).

استنتاج: حتی غلظت های پایین CpG در این پژوهش، اثربخشی سیلیبینین بر سلول سرطان کبد را به طور مشخصی افزایش داده اند. با توجه به اهمیت استفاده از دوزهای پایین دارو و فعال سازی مکانسیم های ایمنی، تجویز توازن این دارو می تواند چشم انداز روشی را برای روش های درمانی ترکیبی آینده داشته باشد.

واژه های کلیدی: سیلیبینین، اولیگوداکسی نوکلئوتیدهای CpG، HepG-2، TLR9، MMP2،

مقدمه

هپاتوسسلولار کارسینوما (HCC) پنجمین سرطان شایع در جهان و دومین علت مرگ در مردان است(۱). به دلیل وجود آنتی بادی ها و یا پروتئین های محلول، HCC نسبت به القا آپوپتوز با واسطه گیرنده مرگ و یا

مولف مسئول: محمد رضا خرمیزاده - تهران: خیابان کارگر شمالی، جنب بیمارستان دکتر شریعتی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم

۱. استادیار، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و انسیتو علوم زیستی، دامغان، ایران

۲. دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. دکترا، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۴. فوق لیسانس بیوتکنولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات بیوسنسر، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۶

تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱/۲۷

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱/۲۷

کلینیکی با CpG-ODN روی انواع سرطان نشان داده است که این ترکیبات به تنها یی فعالیت ضد توموری متوسطی دارند(۱۴،۱۳). به علاوه مطالعات نشان داده اند که ترشح گروه خاصی از اندوپیتیدازها نظیر ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ یا MMP-2 توسط هپاتوسلولار کارسینوما نقش مهمی در متاستاز دارد. هدف این پژوهش مطالعه اثر هم زمان سیلیبینین و CpG-ODN HepG-2 روی رشد سلول های هپاتوسلولار کارسینومای ۲-۱ و تغییرات بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئینازها در این بد خیمی می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، سلول های رده HepG-2 از بانک سلولی انسستیتو پاستور تهران خریداری و در محیط RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ml/ml واحد ۱۰۰ پنیسیلین و ۱۰۰ µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین در شرایط استاندارد (۹۵ درصد CO₂ درصد ۳۷°C) کشت داده شدند. کلیه ترکیبات و مواد به کار رفته از درجه آنالیتیکی برخوردار بودند. در پلیت ۹۶ تایی، سلول HepG-2 به تعداد 3×10^4 به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس در محیط کشت، سیلیبینین (شرکت سیگما-آلدریخ، امریکا)، الیگونوکلیوتیدهای CpG-ODN تیمار و کنترل (شرکت فرایبو تیک، تهران، ایران) اضافه گردید. برای انتخاب بهترین دوز اثر گذاری، سیلیبینین در غلظت های ۱۰۰-۵۰-۲۵-۰ nM و CpG-ODN کنترل و تیمار هر یک در غلظت های ۰-۲۵-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ به محیط کشت افزوده شدند. حجم هر تیمار تنها ۱۰ درصد حجم محیط کشت کامل (محیط کشت + سرم) بود و تیمارها با سه تکرار انجام گرفتند. برای بررسی اثر بازدارندگی سیلیبینین و الیگونوکلیوتیدهای تیمار و کنترل CpG-ODN بر رشد و تکثیر سلول های HepG-2 و انتخاب بهترین غلظت این دو ترکیب برای انجام تیمار هم زمان، از روش های MTT و میزان جذب بر مید ترازو لیوم آبی تیازولیل

آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز توموری مقاوم بوده که این امر نیاز به راهکارهای دیگر برای کنترل رشد HCC و متاستاز را نشان می دهد(۲). با توجه به این که هنوز درمان قطعی و مناسبی برای HCC و پیش گیری از متاستاز آن وجود ندارد، ناگزیر باید اثر ترکیبات گوناگون بر تنظیم کننده های رشد سلول های HCC و توانایی آن ها در مهار رشد و یا القای آپوپتوز مورد مطالعه قرار گیرد. از این رو، امروزه ترکیبات و محصولات طبیعی که منبعی غنی از ترکیبات فعال فارماکولوژیکی با کم ترین میزان سمیت بوده و در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلف استفاده می شوند، مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. سیلیبینین یک ترکیب فلاونولیگتان از گیاه خار مریم (milk thistle; Silybum marianum (L), Gaertn.) است که قرن ها در مناطق مختلف دنیا برای درمان بیماری های گوناگون به کار رفته است(۳). در مطالعات مدل زنده (in vivo) نشان داده شده که سیلیمارین و سیلیبینین، فلاونویید پلی فلی و ترکیب اصلی فعال زیستی خار مریم، هر دو در پیش گیری و درمان انواع سرطان در مدل های جوندگان، و کشت سلول موثر هستند(۴-۶). از سوی دیگر، نقص اینمی معمولأ به نفع رشد تومور و کاهش پاسخ به درمان است. بنابراین، برای درمان سرطان می توان از تحریک سیستم اینمی نظیر فعال کردن آن از طریق گیرنده ناقوس مانند Toll-like receptor (TLR)، به تنهایی یا همراه با دیگر روش های درمانی بهره برد(۷-۹). از آن جا که موتیف های CpG مตیله نشده از طریق TLR سیستم اینمی را تحریک می کنند، اولیگوکداکسی نوکلوتیدهای مصنوعی دارای موتیف های ODNCpG oligodeoxynucleotides CpG متیله نشده (CpG ODN) (ساخته شده اند(۱۰، ۱۱)). چهار خانواده CpG-ODN با ویژگی های ساختاری و زیستی متفاوت موجود است که با استفاده از پیوند فسفوروتیوات طول عمر و مقاومت نسبت به نوکلئازها در آن ها افزایش یافته است(۱۲). کار آزمایی های بالینی فاز یک و دو مطالعات

جهت ارزیابی نیمه کمی فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2)، این آزمون انجام گرفت. بدین منظور، یک نمونه از سوب رویی سلول های تحت آزمایش در ژل پلی اکریلامید ۷ درصد که با سوبستراط ژلاتین کوپلیمریزه شده بود، الکتروفورز گردید. سپس ژل به مدت یک شب در محلول فعال کننده آنزیم قرار داده شده و روز بعد با رنگ کوماسی بلورنگ آمیزی و سپس با حلal رنگ رنگبری شد. ژل ها سپس با استفاده از دستگاه Gel Documentation(UVP) عکسبرداری شده و نهایتاً با استفاده از نرم افزار دانسیتومتری UViTec (UK) مورد آنالیز کمی بر اساس معیار Grey scale قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت نمودارهای ستونی نشان داده شد(۱۷). تفاوت در رشد t-student سلول ها و فعالیت ژلاتیناز به روش تست موردنی بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و مرز استنتاج آماری $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. کلیه نمودارها به کمک نرم افزار Excel 2010 ترسیم شده اند.

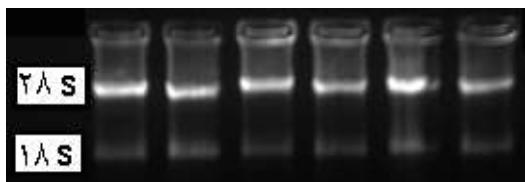
یافته ها

اثرات مهار بر رشد سیلیبینین در غلظت های مختلف از صفر تا یک صد میکرومولار بر سلول های مدل سرطان کبد HepG-2 در نمودار شماره ۱-الف نشان داده شده است. چنان که مشاهده می شود، این ترکیب در تمامی غلظت ها قابلیت مهاری بر سلول های سرطانی را دارد. بر اساس داده های حاضر، بالاترین غلظت به کار رفته از این ترکیب قابلیت مهار کمتر از نیمی از سلول ها را خواهد داشت که به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.05$). هم چنین اثر تیمار سلول های HepG-2 با CpG-ODN^{۲۰۰۶} بر روی رشد سلول ها، نشان دهنده تغییرات اندکی در رشد سلول ها می باشد (نمودار شماره ۱-ب).

(thiazolyl blue tetrazolium bromide) سلول های زنده استفاده شد(۱۵). ۴۸ ساعت پس از تیمار، محیط کشت سلول ها برداشته و $100 \mu\text{l}$ محلول MTT که در محیط بدون فلر رد حل شده بود، به سلول های هر چاهک افزوده و چهار ساعت در 37°C نگهداری شدند. سپس پلیت کاملاً خالی شده و رسو ب فورمازان تشکیل شده در چاهک ها با افزودن $100 \mu\text{l}$ می تیل (DMSO) حل و جذب نوری در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. استخراج RNA از سلول های real-time PCR و انجام HepG-2 کیت SensiMixTM SYBR No-ROX one step (یو لاین، انگلستان) انجام گرفت. Real-time PCR اگر RNA ای استخراج شده آلودگی DNA نشان دهد، پیش از انجام PCR در معرض تیمار با I DNase (فرمنتاز، ایتالیا) قرار گرفت و پس از استخراج دوباره توسط RNase plus (سیناژن، تهران)، بیان ژن ها با استفاده از real-time PCR به روش 600 ng RNA در دستگاه corbett rotor gene 6000 اندازه گیری شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری فرابینفس و خوانش جذب در 260 و 280 نانومتر و تعیین نسبت OD_{280}/OD_{260} اندازه گیری شد. تمامیت RNA نیز با الکتروفورز بر روی ژل آگارز و تعیین نسبت جذب $rRNA$ به $18S$ که بیش از ۱ باید باشد، مشخص گردید(۱۶). توالی پرایمرهای ماتریکس متالوپروتئیناز، GAPDH به عنوان کنترل داخلی، non-CpG ODN 2006 و CpG ODN 2006 در جدول $\Delta C(T)$ شماره ۱ آمده است. میزان بیان نسبی از تفاوت $C(T)$ بین کنترل داخلی به $C(T)$ ژن مورد نظر از طریق محاسبه $\Delta C(T) = -\Delta\Delta C(T)$ محاسبه گردید.

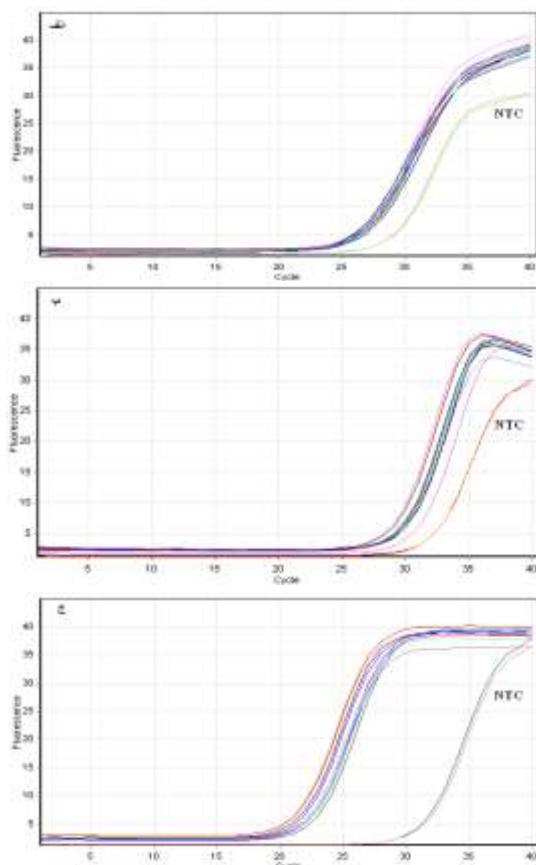
جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

| نام پرایمر | طول | نواحی (5' to 3') | دماهی آبینگ |
|-------------|-----|-----------------------|-------------|
| MMP9-F | ۷۱ | CTTCCAAGTCGGAGCGATGT | ۶۰ °C |
| MMP9-R | ۷۱ | TACCGTCAAAGGGGTATCCAT | ۶۰ °C |
| GAPDH-F | ۱۹ | GCCATCACGCCACAGTTTC | ۵۹/۰ °C |
| GAPDH-R | ۲۵ | ACAACCTTGGTATCGTGAAGG | ۶۰ °C |
| CpG ODN | ۷۳ | TCGTCGTTTGTCTTTGTCGT | ۶۰ °C |
| Non CpG ODN | ۷۳ | TGCTGCCTTGTCTTTGTCGT | ۶۰ °C |

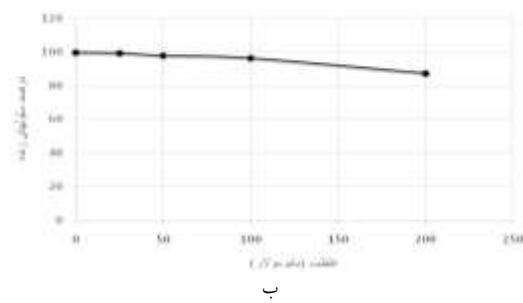
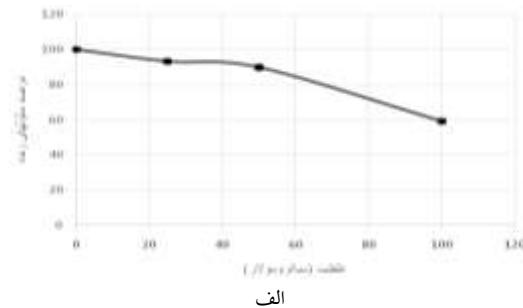


تصویر شماره ۱: استخراج شده برای انجام real-time PCR تک مرحله‌ای

برای مقایسه‌ی بیان ژن‌های MMP-۲ و TLR-۹ به روی real-time PCR تک مرحله‌ای ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل انتخاب گردید. نمودار شماره ۳، بیانگر اختصاصی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های MMP-2 و TLR-۹ و اکنش صحیح PCR می‌باشد. افزایش TLR و فلوئورسانس نسبت به خط پایه در کنترل بدون الگو (NTC) نیز دیده می‌شود (نمودار شماره ۴).



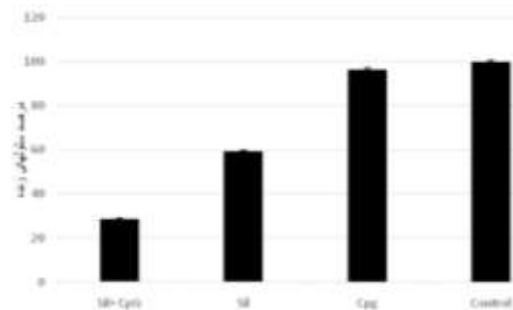
نمودار شماره ۳: نمودار تکثیر ژن‌های از بالا به پایین. (الف) MMP-۲ (ب) TLR-۹ و (ج) GAPDH با پرایمرهای اختصاصی



نمودار شماره ۱: اثرات مهار رشد سیلیسین در غلظت‌های (۰-۵۰-۱۰۰-۲۵۰ میکرومولار). (الف) و CpG-ODN در غلظت‌های (۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ نانومولار)، (ب) متعاقب تیمار شیمیایی

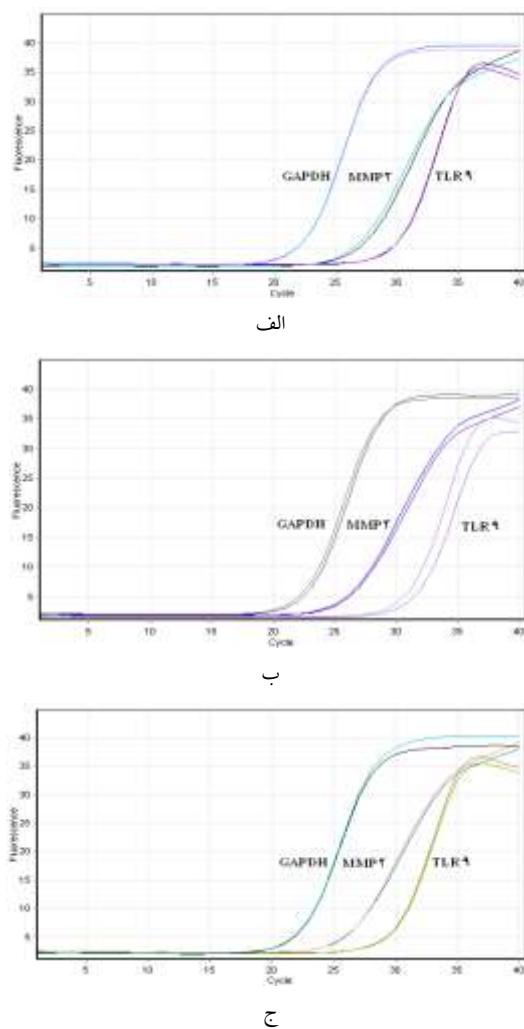
بر اساس نتایج حاصله از تیمار سلول رده سرطانی HepG-2 با سیلیسین و CpG-ODN ترکیب این دو به میزان یک صد میکرو و نانومولار از هر کدام مورد استفاده قرار گرفت. همچنان که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود، استفاده توأم این دو ترکیب ایستایی سلولی را در مقایسه با گروه کنترل تا سه برابر افزایش می‌دهد. این افزایش به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

کیفیت RNA استخراج شده از سلول‌های سرطانی HepG-2 در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

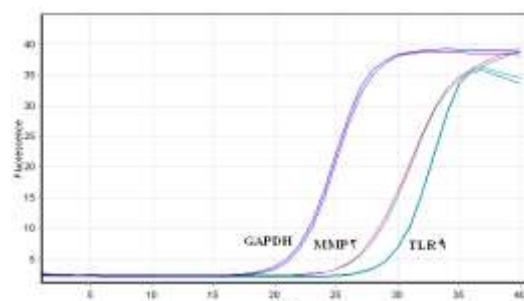


نمودار شماره ۲: بررسی اثرات مهار رشد سیلیسین و CpG-ODN و تیمار توام در غلظت مشخص

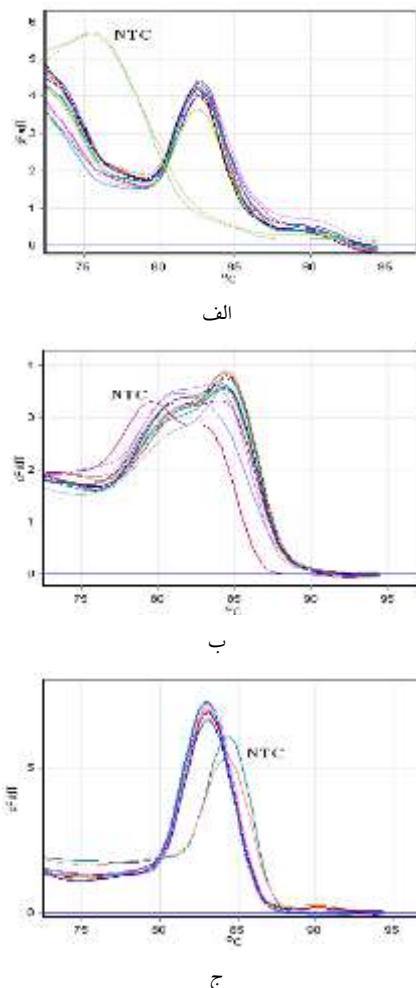
است. نمودارهای شماره ۶ نتایج بیان ژن‌های MMP-2 و ۹- TLR در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۵: نمودار تکثیر ژن‌های ۲، MMP-9 و TLR-9 در سلول‌های HepG2 از بالا به پایین، (الف) سیلیبینین ۱۰۰ μM، (ب) ۱۰۰ nM CpG و (ج) بدون تیمار در محیط کشت کامل (محیط کشت +۱۰ FBS+ ۱درصد).



نمودار شماره ۶: نمودار تکثیر ژن‌های ۲، MMP-9 و TLR-9 در سلول‌های HepG2 تحت تیمار ۱۰۰ μM سیلیبینین +CpG-ODN ۱۰۰ nM در دوره بیست و نهم، شماره ۱۷۱، فروردین ۱۳۹۸



نمودار شماره ۷: منحنی ذوب ژن از بالا به پایین (الف) ۲- MMP-9 و (ب) TLR-9 (peak) (c) GAPDH در NTC (کنترل بدون الگو) وجود دایمرهای پرایمری

اصلًا در بیش تر موارد، نمودار تکثیر NTC یک خط صاف است، ولی در مواردی که پرایمر دایمر در نبود الگو شکل بگیرد، مانند آنچه که در منحنی ذوب قابل تشخیص است، احتمال افزایش فلوئورسانس نسبت به خط پایه در چرخه‌های بعد از ۲۸-۲۵ تکثیر وجود دارد که به معنای تکثیر نخواهد بود. بیان نسبی ژن‌های ۲- MMP و TLR-9 در سلول‌های HepG2 که تحت تیمار سیلیبینین ۱۰۰ μM و ۱۰۰ nM CpG در فرار داشتند، در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است. هم چنان که مشاهده می‌شود، این ترکیبات هر یک به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار در محیط کشت کامل تغییر معناداری در بیان ژن‌های مورد نظر ایجاد ننموده

بحث

و با طراحی پرایمراهای اختصاصی ایزوفرم‌های گوناگون TLR9 می‌توان آن را بررسی نمود(۲۸). در پژوهش‌های حاضر سعی بر آن بود تا کمترین غلظت موثر بر مهار رشد سلول‌های HepG-2 استفاده شود. بر این اساس، سیلیبینین و CpG-ODN به ترتیب در غلظت‌های μM و $100-200 \text{ nM}$ و $25-50 \text{ }\mu\text{M}$ استفاده شدند. با توجه به اثرات مشاهده شده و غلظت سرمی سیلیبینینی که پس از مصرف خوراکی در گردش خون مشاهده می‌شود، غلظت‌های 100 nM و $100 \mu\text{M}$ CpG-ODN سیلیبینین برای انجام تیمار همزمان مدل سلولی هپاتوسلولار کارسینوما انتخاب شدند(۲۹). همچنان که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود استفاده توأم دو ترکیب سیلیبینین و CpG-ODN اثرات ممانتع از رشد سلولی را به طور معنا داری افزایش داده است که این یافته با گزارش Gu و همکاران مطابقت دارد(۲۰). مقاومت در برابر مرگ برنامه ریزی شده سلولی، از دیگر مشکلات درمان هپاتوسلولار کارسینوما است. یکی از سازوکارهای مطرح در این خصوص، افزایش بیان مولکول‌های سطحی از جمله لیگاند Fas (پروتئین غشایی از خانواده خانواده TNF) بوده که قابلیت القا آپوپتوز در لنفوسيت‌های T فعال شده و بدین ترتیب فرار تومور را از فرایندهای دفاعی ممکن می‌سازد. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در Ct تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در گروه‌های آزمایش دیده نشد. شواهدی وجود دارد که استفاده از CpG-ODN در مدل سلولی HepG2 میزان بیان FasL را به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهد(۳۰). از سویی یافته‌های Liang و همکاران نشان می‌دهند که غلظت‌های زیر پانصد نانومولار اثرات مهاری اندکی را در این مدل سلولی نشان می‌دهند ولی امکان تداخل در چرخه سلولی و القا فاکتورهای ضد آپوپتوز نظری سروایوین را دارا می‌باشند که در مجموع توقف رشد سلول و ایستایی معنادار مشاهده در این مطالعه توسط اثر سینرژیسم این ترکیبات قابل توجیه خواهد بود(۳۱). ماتریکس متالوپروتیینازها در

هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) به واسطه تهاجم به عروق و نرخ رشد سریع، پیش آگهی خوبی نداشته و معمولاً به دلیل تشخیص دیر هنگام، بیماران مبتلا درمان مناسبی دریافت نمی‌نمایند. در حال حاضر، روش درمان استاندارد عمدتاً نقش تسکینی دارد، لذا با استفاده از مدل‌های سلولی مناسب نظری سلول‌های HepG-2، مطالعه ترکیبات مختلف و یا روش‌های جدید ممکن می‌گردد(۱۸). از جمله این ترکیبات، سیلیبینین است که قرن‌ها در طب سنتی به کار رفته است. اثر مهاری وابسته به دوز و زمان سیلیبینین بر روی رشد سلول‌های HepG-2 اولین بار توسط Varghese و همکارانش نشان داده شد(۱۹). در راستای یافته‌های Gu و Pook و همکاران Lah و همکاران، این مطالعه نیز نشان داد که مقادیر افزایش یابنده سیلیبینین، اثرات مهاری وابسته به دوز بر رشد سلول HepG-2 داشته و از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله مهار فعالیت فاکتور رشد اپیدرمی از تکثیر سلول جلوگیری می‌کند(۲۰-۲۲). توانایی تحریک کنندگی و فعال‌سازی CpG-۲۰۰۶ ODN برای اولین بار روی لنفوسيت‌های B نشان داده شد(۲۳). یافته‌های ما بر عدم قابلیت این ترکیب در ایستایی و یا مرگ سلولی در مدل سلولی هپاتوسلولار کارسینوما گواهی دارد که با نتایج پژوهش برخی از محققین هم راستاست(۲۴، ۲۵).

از سویی، مطالعاتی دیگر بر قابلیت القا تکثیر CpG-ODN^{۲۰۰۶} در برخی انواع لنفوما و میلوم مالتیپل اشاره می‌کنند(۲۶، ۲۷). از آن‌جا که اولیگوکواداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی دارای موتیف‌های CpG متیله نشده، آگونیست گیرنده TLR9 هستند، ارزیابی بیان این گیرنده صورت گرفت. هم‌چنان که در نمودار ۴-ب مشاهده می‌شود، در منحنی ذوب ژن TLR9، بیش از یک قله وجود دارد. اخیراً گزارشاتی دال بر پلی‌مورفیسم در گیرنده TLR9 منتشر شده است که تا حدودی می‌تواند پهن بودن منحنی ذوب را روشن کند

TLR9 موجب بیان MMP-2 شد، لذا اثرات مهاری سیلیبینین بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها را کاهش داده است. با توجه به یافته های موجود در بدخیمی های با خصوصیات HCC، تجویز ترکیباتی با قابلیت تحریک اینمی، می تواند کاهش دوز داروهایی نظیر سیلیبینین را به همراه داشته باشد. پیامد تقلیل مقدار دارو، از یک سو کاهش عوارض جانبی و سمیت برای سلول های سالم و از سوی دیگر کنترل سلول های سرطانی با تحریک مسیر های مختلف پیام رسانی و ممانعت از متاستاز خواهد بود که با انجام مطالعات بیشتر می توان کاربردهای درمانی آن را محقق نمود.

سپاسگزاری

بخشی از بودجه این طرح از محل طرح پژوهشی شماره ۹۷۴۱ مصوب مرکز تحقیقات زیست فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردیده است و بدین وسیله از آن مرکز تشکر می گردد.

References

1. Hayashi T, Yamashita T, Terashima T, Suda T, Okada H, Asahina Y, et al. Serum cytokine profiles predict survival benefits in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 870.
2. Villanueva-Paz M, Cordero MD, Pavón AD, Vega BC, Cotán D, De la Mata M, et al. Amitriptyline induces mitophagy that precedes apoptosis in human HepG2 cells. *Genes Cancer* 2016; 7(7-8): 260-277.
3. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)- Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* 2017; 22(11): E1942.
4. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 2017; 22(2): E191.
5. Bijak M, Synowiec E, Sitarek P, Sliwiński T, Saluk-Bijak J. Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Flavonolignans in Different Cellular Models. *Nutrients* 2017; 9(12): E1356.
6. Zou H, Zhu XX, Zhang GB, Ma Y, Wu Y, Huang DS. Silibinin: an old drug for hematological disorders. *Oncotarget* 2017; 8(51): 89307-89314.
7. Kudo M. Immuno-Oncology in Hepatocellular Carcinoma: 2017 Update. *Oncology* 2017; 93 (Suppl 1): 147-159.
8. Han Q, Wang Y, Pang M, Zhang J. STAT3-blocked whole-cell hepatoma vaccine induces cellular and humoral immune response

هپاتوسلوار کارسینوما افرايش یافته و با القای فرایند متاستار، درمان را دشوار می سازند. یافته های پیشین محقق و سایرین بر اثرات کاهش بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها به خصوص 2 MMP از طریق سازو کارهای مختلف پیام رسان تاکید دارند(۳۲-۳۴). نتایج استفاده از تکنیک زایمو گرافی برای مشاهده مستقیم آنزیم های پروتولیتیک در ظل واحد سوبسترا در این مطالعه نشان داد که فعالیت 2 MMP در گروه سیلیبینین و CpG-ODN با کنترل بدون تیمار تفاوت دارد (داده ها نشان داده نشده است). این در حالی است که یافته های موجود، کاهش بیان ژن 2 MMP را نشان نمی دهد. Ruan و همکاران افرايش فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز دو پس از فعل شدن گیرنده TLR9 را گزارش نموده اند(۳۵). از آن جا که در این تحقیق، سلول سرطانی تحت تیمار هم زمان یک تحریک گتنده سیستم اینمی (CpG-ODN) با سیلیبین قرار گرفت، به نظر می رسد که CpG-ODN از طریق تحریک گیرنده

- against HCC. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36(1): 156.
9. Pohar J, Lainšček D, Kunšek A, Cajnko MM, Jerála R, Benčina M. Phosphodiester backbone of the CpG motif within immunostimulatory ODN augments activation of Toll-like receptor 9. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14598.
 10. Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsive -ness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16): 9237-9242.
 11. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 515-531.
 12. Bai L, Chen W, Chen J, Li W, Zhou L, Niu C, et al. Heterogeneity of Toll-like receptor 9 signaling in B cell malignancies and its potential therapeutic application. *J Transl Med* 2017; 15(1): 51.
 13. Ursu R, Carpentier A, Metellus P, Lubrano V, Laigle-Donadey F, Capelle L, et al. Intracerebral injection of CpG oligonucleotide for patients with de novo glioblastoma-A phase II multicentric, randomised study. *Eur J Cancer* 2017; 73: 30-37.
 14. Lubaroff DM, Vaena D, Brown JA, Zehr P, Griffith KC, Brown E, et al. Vaccine immunotherapy for prostate cancer: from mice to men. *Immunol Res* 2014; 59(1-3): 229-235.
 15. Momeny M, Khorramizadeh MR, Ghaffari SH, Yousefi M, Yekaninejad MS, Esmaeili R, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2008; 591(1-3): 13-20.
 16. Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, Parise G, et al. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol Genomics* 2004; 18(2): 226-231.
 17. Khorramizadeh MR, Aalizadeh N, Pezeshki M, Ghahary A, Zeraati H, Berahmeh A, et al. Determination of gelatinase A using a modified indirect hemagglutination assay in human prostate cancer screening and assessment of its correlation with prostate-specific antigen parameters. *Int J Urol* 2005; 12(7): 637-643.
 18. Altekruse SF, McGlynn KA, Dickie LA, Kleiner DE. Hepatocellular carcinoma confirmation, treatment, and survival in surveillance, epidemiology, and end results registries, 1992-2008. *Hepatology* 2012; 55 (2):476-482.
 19. Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(23): 8441-8448.
 20. Gu HR, Park SC, Choi SJ, Lee JC, Kim YC, Han CJ, et al. Combined treatment with silibinin and either sorafenib or gefitinib enhances their growth-inhibiting effects in hepatocellular carcinoma cells. *Clin Mol Heppatol* 2015; 21(1): 49-59.
 21. Pook SH, Toh CK, Mahendran R. Combination of thiol antioxidant Silibinin with Brostallicin is associated with increase in the anti-apoptotic protein Bcl-2 and decrease in caspase 3 activity. *Cancer Lett* 2006; 238(1):146-152.
 22. Lah JJ, Cui W, Hu KQ. Effects and mechanisms of silibinin on human

- hepatomacell lines. *World J Gastroenterol* 2007; 13(40): 5299-5305.
23. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164(2): 944-953.
 24. Noack J, Jordi M, Zauner L, Alessi D, Burch A, Tingueley M, et al. TLR9 agonists induced cell death in Burkitt's lymphomacells is variable and influenced by TLR9 polymorphism. *Cell Death Dis* 2012; 3(6): e323.
 25. Khorramizadeh MR, Hosseinzadeh S, Safavifar F, Saadat F, Aalizadeh N, Falak R, et al. Interaction of CpG-oligodeoxynucleotides with Toll like receptor 9 induces apoptosis and modulates metaloproteinase-2 activity in human intestinal epithelium. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2007; 6(3): 107-114.
 26. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Fløttum M, Knudsen L, Børset M, et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20(6): 1138-1144.
 27. Henault M, Lee LN, Evans GF, Zuckerman SH. The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG oligonucleotides. *J Immunol Methods* 2005; 300(1-2): 93-99.
 28. Bai L, Chen W, Chen J, Li W, Zhou L, Niu C, et al. Heterogeneity of Toll-like receptor 9 signaling in B cell malignancies and its potential therapeutic application. *J Transl Med* 2017; 15(1): 1152-1155.
 29. Ezhilarasan D, Evraerts J, Brice S, Buc Calderon P, Karthikeyan S, Sokal E, et al. Silibinin Inhibits Proliferation and Migration of Human Hepatic Stellate LX-2 Cells. *J Clin Exp Hepatol* 2016; 6(3):167-174.
 30. Zheng J, Fu R, Li J, Wang X. CpG oligonucleotides suppress HepG2 cells-induced Jurkat cell apoptosis via the Fas-FasL-mediated pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30: 48.
 31. Liang S, Hu G, Fang L, Huang S, Li J, Zhao M, et al. CpG oligodeoxynucleotides enhance chemosensitivity of 5-fluorouracil in HepG2 human hepatoma cells via downregulation of the antiapoptotic factors survivin and livin. *Cancer Cell International* 2013, 13(1):106.
 32. Ghasemi R, Ghaffari SH, Momeny M, Pirouzpanah S, Yousefi M, Malehmir M, et al. Multitargeting and antimetastatic potentials of silibinin in human HepG-2 and PLC/PRF/5 hepatoma cells. *Nutr Cancer* 2013; 65(4): 590-599.
 33. Polachi N, Bai G, Li T, Chu Y, Wang X, Li S, et al. Modulatory effects of silibinin in various cell signaling pathways against liver disorders and cancer-A comprehensive review. *Eur J Med Chem* 2016; 123: 577-595.
 34. Ren T, Zhu L, Cheng M. CXCL10 accelerates EMT and metastasis by MMP-2 in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res* 2017; 9(6): 2824-2837.
 35. Ruan M, Zhang Z, Li S, Yan M, Liu S, Yang W, Wang L, et al. Activation of Toll-like receptor-9 promotes cellular migration via up-regulating MMP-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014; 9(3): e92748.