

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, Guilan 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 Biothecnology, 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, Biothecnology 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 μ M) 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 mechnasims are definitely preferred, therefore, the co-adminstration 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 مهارتی تیمار هم‌زمان سیلیبینین و الیگونوکلوئوتید CpG-ODN بر بیان ژن‌های MMP-2 و TLR-9 در رده سلول‌های سرطان کبد

آرزو رضایی^۱فرشید سعادت^۲فرناز صفوی فر^۳آذر برهمه^۴محمدرضا خرمی‌زاده^{۵*}

چکیده

سابقه و هدف: هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) سرطانی شایع است و تحریک سیستم ایمنی از طریق TLR-9 (Toll-like receptors) به وسیله ۲۰۰۶ CpG-ODN می‌تواند در درمان آن کارایی داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر تیمار هم‌زمان سیلیبینین و ۲۰۰۶ CpG-ODN بر رشد و تکثیر مدل سلولی HCC می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اثر بازدارندگی دوزهای متفاوت سیلیبینین و ۲۰۰۶ CpG-ODN بر رشد سلول‌های HepG2 و تعیین بهترین غلظت برای تیمار هم‌زمان به روش MTT سنجیده شد. میزان بیان ژن‌های TLR9 و MMP2 به روش Real-Time PCR سنجیده شد. فعالیت ماتریکس متالوپروتیناز MMP2 با روش زایموگرافی اندازه‌گیری گردید. **یافته‌ها:** به ترتیب، غلظت‌های ۱۰۰ μM و ۱۰۰ nM از سیلیبینین و ۲۰۰۶ CpG-ODN برای انجام تیمار هم‌زمان انتخاب شدند که اثرات ایستایی شدیدی بر رشد سلول داشتند ($P < ۰/۰۵$). نتایج Real-Time PCR تفاوت معنی‌داری در Ct تکثیر ژن‌ها نشان نداد ($P > ۰/۰۵$).

استنتاج: حتی غلظت‌های پایین CpG در این پژوهش، اثربخشی سیلیبینین بر سلول سرطان کبد را به طور مشخصی افزایش داده‌اند. با توجه به اهمیت استفاده از دوزهای پایین دارو و فعال‌سازی مکانسیم‌های ایمنی، تجویز توام این دو دارو می‌تواند چشم‌انداز روشنی را برای روش‌های درمانی ترکیبی آینده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سیلیبینین، اولیگوداکسی‌نوکلئوتیدهای CpG، MMP2، TLR9، HepG-2

مقدمه

هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) پنجمین سرطان شایع در جهان و دومین علت مرگ در مردان است (۱). به دلیل وجود آنتی‌بادی‌ها و یا پروتئین‌های محلول، HCC نسبت به القا آپوپتوز با واسطه گیرنده مرگ و یا

مؤلف مسئول: محمدرضا خرمی‌زاده - تهران: خیابان کارگر شمالی، جنب بیمارستان دکتر شریعی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم E-mail: khoramza@sina.tums.ac.ir

۱. استادیار، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی و انستیتو علوم زیستی، دامغان، ایران

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

۳. دکتر، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشگاه علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

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

۵. استاد، مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشگاه 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 ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۱۴

آپوپتوز وابسته به فاکتور نکروز توموری مقاوم بوده که این امر نیاز به راهکارهای دیگر برای کنترل رشد HCC و متاستاز را نشان می‌دهد (۲). با توجه به این که هنوز درمان قطعی و مناسبی برای HCC و پیش‌گیری از متاستاز آن وجود ندارد، ناگزیر باید اثر ترکیبات گوناگون بر تنظیم‌کننده‌های رشد سلول‌های HCC و توانایی آن‌ها در مهار رشد و یا القای آپوپتوز مورد مطالعه قرار گیرد. از این‌رو، امروزه ترکیبات و محصولات طبیعی که منبعی غنی از ترکیبات فعال فارماکولوژیکی با کم‌ترین میزان سمیت بوده و در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند، مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. سیلیبین یک ترکیب فلاونولیگنان از گیاه خار مریم (milk thistle; *Silybum marianum* (L), Gaertn.) است که قرن‌ها در مناطق مختلف دنیا برای درمان بیماری‌های گوناگون به کار رفته است (۳). در مطالعات مدل زنده (in vivo) نشان داده شده که سیلیمارین و سیلیبین، فلاونوئید پلی‌فنلی و ترکیب اصلی فعال زیستی خار مریم، هر دو در پیش‌گیری و درمان انواع سرطان در مدل‌های جوندگان و کشت سلول موثر هستند (۴-۶). از سوی دیگر، نقص ایمنی معمولاً به نفع رشد تومور و کاهش پاسخ به درمان است. بنابراین، برای درمان سرطان می‌توان از تحریک سیستم ایمنی نظیر فعال کردن آن از طریق گیرنده ناقوس مانند Toll-like receptor (TLR)، به تنهایی یا همراه با دیگر روش‌های درمانی بهره‌برد (۷-۹). از آن‌جا که موتیف‌های CpG متیله نشده از طریق TLR سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند، اولیگوداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی دارای موتیف‌های CpG متیله نشده (CpG ODN oligodeoxynucleotides) ساخته شده‌اند (۱۰، ۱۱). چهار خانواده CpG-ODN با ویژگی‌های ساختاری و زیستی متفاوت موجود است که با استفاده از پیوند فسفروتیوات طول عمر و مقاومت نسبت به نوکلئازها در آن‌ها افزایش یافته است (۱۲). کارآزمایی‌های بالینی فاز یک و دو مطالعات

کلینیکی با CpG-ODN روی انواع سرطان نشان داده است که این ترکیبات به تنهایی فعالیت ضد توموری متوسطی دارند (۱۳، ۱۴). به علاوه مطالعات نشان داده‌اند که ترشح گروه خاصی از اندوپتیدازها نظیر ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ یا MMP-2 توسط هپاتوسلولار کارسینوما نقش مهمی در متاستاز دارد. هدف این پژوهش مطالعه اثر هم‌زمان سیلیبین و CpG-ODN بر روی رشد سلول‌های هپاتوسلولار کارسینوما HepG-2 و تغییرات بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئینازها در این بدخیمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های رده HepG-2 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری و در محیط RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ پنیسیلین و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین در شرایط استاندارد (37°C ، ۹۵ درصد رطوبت، 5 CO_2 درصد) 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، سیلیبین (شرکت سیگما-آلد ریخ، آمریکا)، الیگونوکلیوتیدهای CpG-ODN (شرکت فزیوتیک، تهران، ایران) اضافه گردید. برای انتخاب بهترین دوز اثرگذاری، سیلیبین در غلظت‌های $100-50-25 \mu\text{M}$ و CpG-ODN کنترل و تیمار هر یک در غلظت‌های $200-100-50-25 \text{ nM}$ 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 سیلیبین و الیگونوکلیوتیدهای تیمار و کنترل CpG-ODN بر رشد و تکثیر سلول‌های HepG-2 و انتخاب بهترین غلظت این دو ترکیب برای انجام تیمار هم‌زمان، از روش‌های MTT و میزان جذب برمید ترازولیوم آبی تیازولیل

جهت ارزیابی نیمه کمی فعالیت آنزیم ماتریکس متالوپروتیناز-۲ (MMP-2)، این آزمون انجام گرفت. بدین منظور، یک نمونه از سوپ روی سلول‌های تحت آزمایش در ژل پلی‌اکریلامید ۷ درصد که با سوبسترای ژلاتین کوپلیمریزه شده بود، الکتروفورز گردید. سپس ژل به مدت یک شب در محلول فعال‌کننده آنزیم قرار داده شده و روز بعد با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی و سپس با حلال رنگ رنگبری شد. ژل‌ها سپس با استفاده از دستگاه Gel Documentation (UVP) عکسبرداری شده و نهایتاً با استفاده از نرم افزار دانسیتومتری UViTech (UK) مورد آنالیز کمی بر اساس معیار Grey scale قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت نمودارهای ستونی نشان داده شد (۱۷). تفاوت در رشد سلول‌ها و فعالیت ژلاتیناز به روش تست t-student مورد 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.

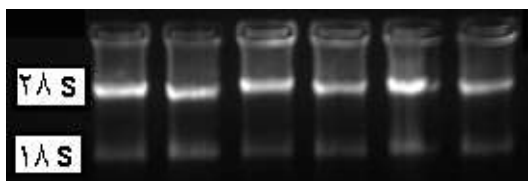
یافته ها

اثرات مهار بر رشد سیلیسین در غلظت‌های مختلف از صفر تا یک صد میکرومولار بر سلول‌های مدل سرطان کبد HepG-2 در نمودار شماره ۱-الف نشان داده شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود، این ترکیب در تمامی غلظت‌ها قابلیت مهار بر سلول‌های سرطانی را داراست. بر اساس داده‌های حاضر، بالاترین غلظت به کار رفته از این ترکیب قابلیت مهار کم‌تر از نیمی از سلول‌ها را خواهد داشت که به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.05$). هم‌چنین اثر تیمار سلول‌های HepG-2 با CpG-ODN $_{2006}$ بر روی رشد سلول‌ها، نشان‌دهنده تغییرات اندکی در رشد سلول‌ها می‌باشد (نمودار شماره ۱-ب).

(thiazolyl blue tetrazolium bromide) توسط سلول‌های زنده استفاده شد (۱۵). ۴۸ ساعت پس از تیمار، محیط کشت سلول‌ها برداشته و ۱۰۰ μ l محلول MTT که در محیط بدون فنل رد حل شده بود، به سلول‌های هر چاهک افزوده و چهار ساعت در 37°C نگهداری شدند. سپس پلِت کاملاً خالی شده و رسوب فورمازان تشکیل شده در چاهک‌ها با افزودن ۱۰۰ μ l دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) حل و جذب نوری در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. استخراج RNA از سلول‌های HepG-2 و انجام real-time PCR تک مرحله‌ای با کیت SensiMixTM SYBR No-ROX one step Real-time PCR (بیو لاین، انگلستان) انجام گرفت. اگر RNA ی استخراج شده آلودگی DNA نشان می‌داد، پیش از انجام PCR در معرض تیمار با DNase I (فرمنتاز، ایتالیا) قرار گرفت و پس از استخراج دوباره توسط RNxplus (سیناژن، تهران)، بیان ژن‌ها با استفاده از ۶۰۰ ng RNA به روش real-time PCR در دستگاه corbett rotor gene 6000 اندازه‌گیری شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری فرابنفش و خوانش جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و تعیین نسبت OD $_{260}$ /OD $_{280}$ اندازه‌گیری شد. تمامیت RNA نیز با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و تعیین نسبت جذب rRNA ۲۸S به ۱۸S که بیش از ۱ باید باشد، مشخص گردید (۱۶). توالی پرایمرهای ماتریکس متالوپروتیناز، GAPDH به عنوان کنترل داخلی، CpG ODN 2006 و non-CpG ODN 2006 در جدول شماره ۱ آمده است. میزان بیان نسبی از تفاوت $\Delta\text{C(T)}$ بین C(T) کنترل داخلی به C(T) ژن مورد نظر از طریق محاسبه $2^{-\Delta\Delta\text{C(T)}}$ محاسبه گردید.

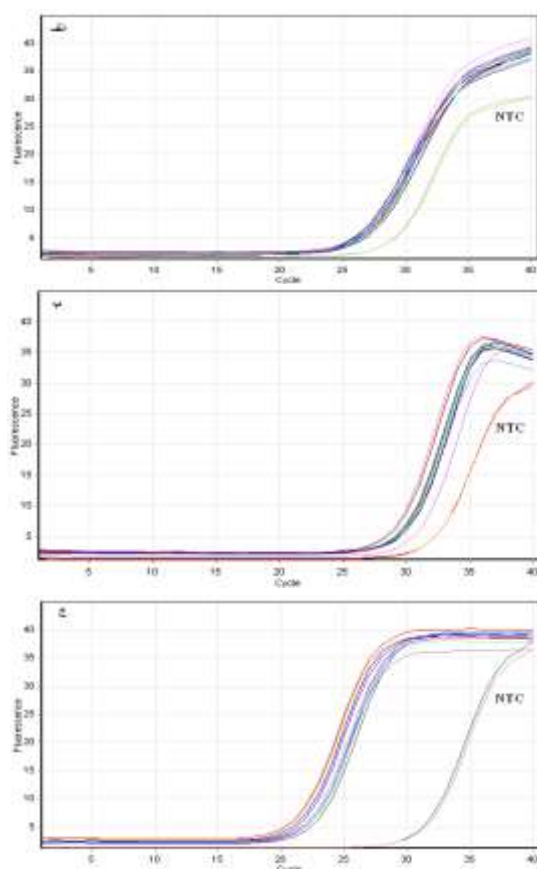
جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	طول	توالی (5' to 3')	دمای آنبلینگ
MMP9-F	۲۱	CTTCCAAGTCTGGAGCGATGT	60°C
MMP9-R	۲۱	TACCGTCAAAGGGGTATCCAT	60°C
GAPDH-F	۱۹	GCCATCACGCCACAGTTTC	$59/50^{\circ}\text{C}$
GAPDH-R	۲۵	ACAACCTTTGGTATCGTGAAGG	60°C
CpG ODN	۳۳	TCGTCGTTTTGTGCTTTTGTGCT	60°C
Non CpG ODN	۳۳	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCT	60°C

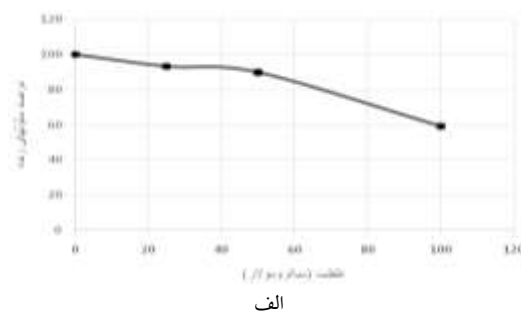


تصویر شماره ۱: RNA استخراج شده برای انجام real-time PCR تک مرحله‌ای

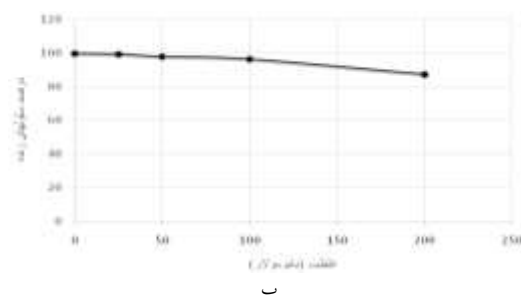
برای مقایسه‌ی بیان ژن‌های ۲-MMP و ۹-TLR به روش real-time PCR تک مرحله‌ای ژن گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل انتخاب گردید. نمودار شماره ۳، بیانگر اختصاصی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های ۲-MMP و ۹-TLR و واکنش صحیح PCR می باشد. افزایش فلوئورسانس نسبت به خط پایه در کنترل بدون الگو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



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



الف

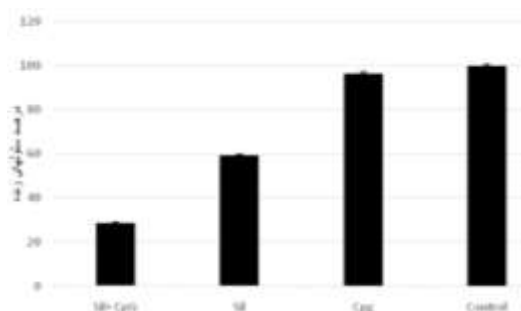


ب

نمودار شماره ۱: اثرات مهار رشد سیلیسین در غلظت‌های ۲۵-۵۰-۱۰۰ میکرومولار. (الف) و CpG-ODN در غلظت‌های ۲۵-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ نانومولار، (ب) متعاقب تیمار شیمیایی

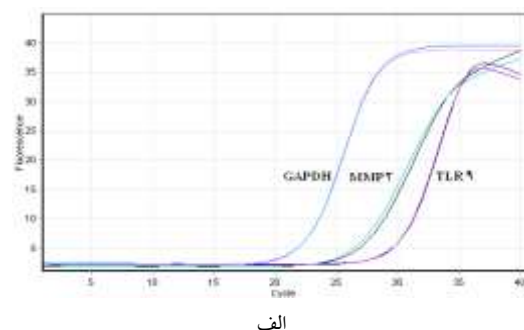
بر اساس نتایج حاصله از تیمار سلول رده سرطانی HepG-2 با سیلیسین و CpG-ODN در دوزهای مختلف، ترکیب این دو به میزان یک صد میکرو و نانومولار از هر کدام مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنان که در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود، استفاده توأم این دو ترکیب ایستایی سلولی را در مقایسه با گروه کنترل تا سه برابر افزایش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

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

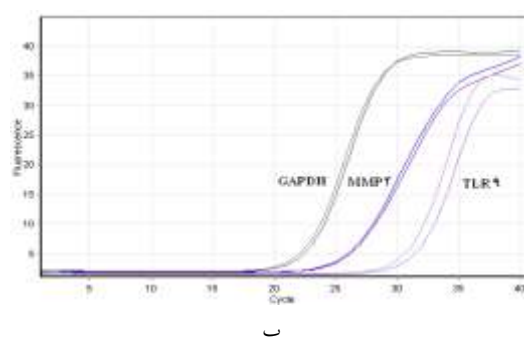


نمودار شماره ۲: بررسی اثرات مهار رشد سیلیسین و CpG-ODN تیمار توأم در غلظت مشخص

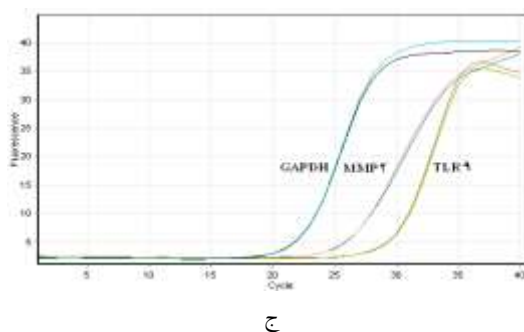
است. نمودارهای شماره ۶ نتایج بیان ژن‌های MMP-2 و TLR-9 در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



الف

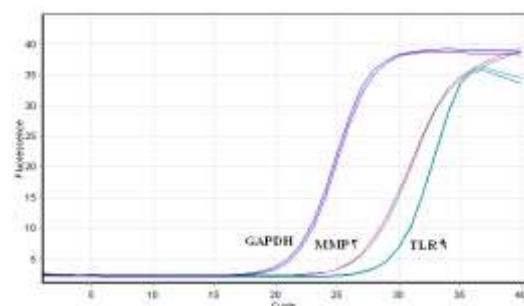


ب

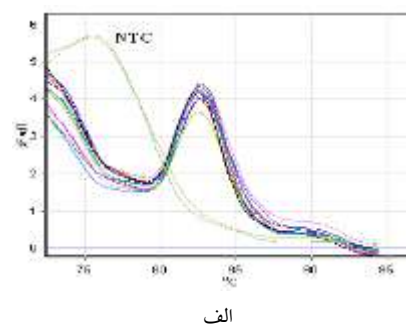


ج

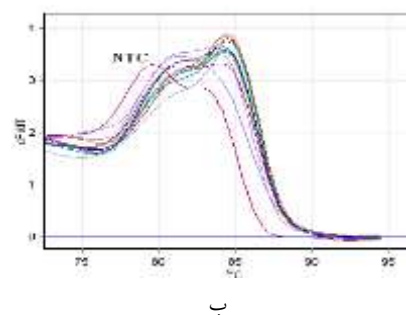
نمودار شماره ۵: نمودار تکثیر ژن‌های MMP-2، TLR-9 و GAPDH در سلول‌های HepG2 از بالا به پایین، (الف) سیلیبینین ۱۰۰ μM، (ب) ۱۰۰ nM CpG، (ج) بدون تیمار در محیط کشت کامل (محیط کشت + FBS ۱۰ درصد).



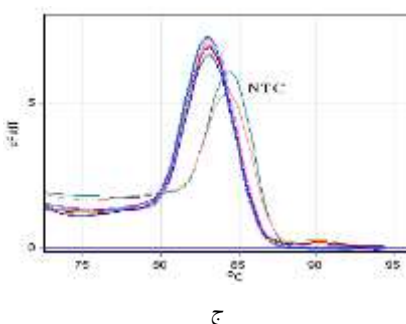
نمودار شماره ۶: نمودار تکثیر ژن‌های MMP-2، TLR-9 و GAPDH در سلول‌های HepG2 تحت تیمار ۲۰۰۶ CpG-ODN + سیلیبینین ۱۰۰ μM



الف



ب



ج

نمودار شماره ۴: منحنی ذوب ژن از بالا به پایین (الف) MMP-2 (ب) TLR-9 و (ج) GAPDH. قله (peak) در NTC (کنترل بدون الگو) وجود دایمرهای پرایمری

اصولاً در بیش‌تر 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 ۲۵-۲۸ تکثیر وجود دارد که به معنای تکثیر نخواهد بود. بیان نسبی ژن‌های MMP-2 و TLR-9 در سلول‌های HepG2 که تحت تیمار سیلیبینین ۱۰۰ μM و ۱۰۰ nM CpG قرار داشتند، در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است. هم‌چنان 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

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 نمی نمایند. در حال حاضر، روش درمان استاندارد عمدتاً نقش تسکینی دارد، لذا با استفاده از مدل های سلولی مناسب نظیر سلول های HepG-2، مطالعه ترکیبات مختلف و یا روش های جدید ممکن می گردد (۱۸). از جمله این ترکیبات، سیلیبین است که قرن ها در طب سنتی به کار رفته است. اثر مهاری وابسته به دوز و زمان سیلیبین بر روی رشد سلول های HepG-2، اولین بار توسط Varghese و همکارانش نشان داده شد (۱۹). در راستای یافته های Gu و همکاران، Pook و همکاران و Lah و همکاران، این مطالعه نیز نشان داد که مقادیر افزایش یابنده سیلیبین، اثرات مهاری وابسته به دوز بر رشد سلول HepG-2 داشته و از طریق مکانیسم های مختلف از جمله مهار فعالیت فاکتور رشد اپیدرمی از تکثیر سلول جلوگیری می کند (۲۲-۲۰). توانایی تحریک کنندگی و فعال سازی CpG-۲۰۰۶ ODN برای اولین بار روی لنفوسیت های B نشان داده شد (۲۳). یافته های 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 راستا است (۲۴، ۲۵).

از سویی، مطالعاتی دیگر بر قابلیت القا تکثیر CpG-ODN۲۰۰۶ در برخی انواع لنفوما و میلوم مالتیل اشاره می کنند (۲۶، ۲۷). از آن جا که اولیگوداکسی نوکلئوتیدهای مصنوعی دارای موتیف های CpG متیله نشده، آگونیست گیرنده TLR9 هستند، ارزیابی بیان این گیرنده صورت گرفت. هم چنان که در نمودار ۴-ب مشاهده می شود، در منحنی ذوب ژن TLR9، بیش از یک قله وجود دارد. اخیراً گزارشاتی دال بر پلی مورفیسم در گیرنده TLR9 منتشر شده است که تا حدودی می تواند پهن بودن منحنی ذوب را روشن کند

و با طراحی پرایمرهای اختصاصی ایزوفرم های گوناگون TLR9 می توان آن را بررسی نمود (۲۸). در پژوهش حاضر سعی بر آن بود تا کم ترین غلظت موثر بر مهار رشد سلول های HepG-2 استفاده شود. بر این اساس، سیلیبین و CpG-ODN به ترتیب در غلظت های ۱۰۰-۲۵۰-۱۰۰۰-۲۵۰ nM و ۲۵-۵۰-۱۰۰-۲۵۰ nM استفاده شدند. با توجه به اثرات مشاهده شده و غلظت سرمی سیلیبینی که پس از مصرف خوراکی در گردش خون مشاهده می شود، غلظت های ۱۰۰ nM CpG-ODN و ۱۰۰ μM سیلیبین برای انجام تیمار هم زمان مدل سلولی هپاتوسلولار کارسینوما انتخاب شدند (۲۹). همچنان که در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود استفاده توأم دو ترکیب سیلیبین و CpG-ODN اثرات ممانعت 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 سازوکار های مطرح در این خصوص، افزایش بیان مولکول های سطحی از جمله لیگاند Fas (پروتئین غشایی از خانواده خانواده TNF) بوده که قابلیت القا آپوپتوز در لنفوسیت های T فعال شده و بدین ترتیب فرار تومور را از فرایندهای دفاعی ممکن می سازد. در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری در Ct تکثیر ژن های مورد مطالعه در گروه های 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 می دهد (۳۰). از سویی یافته های Liang و همکاران نشان می دهند که غلظت های زیر پانصد نانومولار اثرات مهاری اندکی را در این مدل سلولی نشان می دهند ولی امکان تداخل در چرخه سلولی و القا فاکتورهای ضد آپوپتوز نظیر سروایوین را دارا می باشند که در مجموع توقف رشد سلول و ایستایی معنادار مشاهده در این مطالعه توسط اثر سینرژیک این ترکیبات قابل توجه خواهد بود (۳۱). ماتریکس متالوپروتینازها در

TLR9 موجب بیان MMP-2 شد، لذا اثرات مهاري سیلیبینین بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها را کاهش داده است. با توجه به یافته‌های موجود در بدخیمی‌های با خصوصیات HCC، تجویز ترکیباتی با قابلیت تحریک ایمنی، می‌تواند کاهش دوز داروهای نظیر سیلیبینین را به همراه داشته باشد. پیامد تقلیل مقدار دارو، از یک سو کاهش عوارض جانبی و سمیت برای سلول‌های سالم و از سوی دیگر کنترل سلول‌های سرطانی با تحریک مسیرهای مختلف پیام‌رسانی و ممانعت از متاستاز خواهد بود که با انجام مطالعات بیش‌تر می‌توان 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 می‌گردد.

هپاتوسلولار کارسینوما افزایش یافته و با القای فرایند متاستاز، درمان را دشوار می‌سازند. یافته‌های پیشین محقق و سایرین بر اثرات کاهش بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها به خصوص MMP 2 از طریق سازوکارهای مختلف پیام‌رسان تاکید دارند (۳۴-۳۲، ۱۵). نتایج استفاده از تکنیک زایموگرافی برای مشاهده مستقیم آنزیم‌های پروتئولیتیک در ژل واجد سوبسترا در این مطالعه نشان داد که فعالیت MMP 2 در گروه سیلیبینین و CpG-ODN با کنترل بدون تیمار تفاوت دارد (داده‌ها نشان داده نشده است). این در حالی است که یافته‌های موجود، کاهش بیان ژن MMP 2 را نشان نمی‌دهد. Ruan و همکاران افزایش فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز دو پس از فعال شدن گیرنده TLR9 را گزارش نموده‌اند (۳۵). از آن‌جا که در این تحقیق، سلول سرطانی تحت تیمار هم‌زمان یک تحریک‌کننده سیستم ایمنی (CpG-ODN) با سیلیبینین قرار گرفت، به نظر می‌رسد که CpG-ODN از طریق تحریک گیرنده

References

- 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.
- 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.
- Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)- Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules* 2017; 22(11): E1942.
- Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules* 2017; 22(2): E191.
- 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.
- 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.
- Kudo M. Immuno-Oncology in Hepatocellular Carcinoma: 2017 Update. *Oncology* 2017; 93 (Suppl 1): 147-159.
- Han Q, Wang Y, Pang M, Zhang J. STAT3-blocked whole-cell hepatoma vaccine induces cellular and humoral immune response

- against HCC. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36(1): 156.
9. Pohar J, Lainšček D, Kunšek A, Cajnko MM, Jerala 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 Hepatol* 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, Tinguely 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. Khorramzadeh 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 metalloproteinase-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.