

## *An Overview on the Effects of Silibinin on Different MicroRNAs Expression in Cancer*

Vahid Akbari Kordkheyl<sup>1</sup>,  
Setareh Zarpou<sup>2</sup>,  
Ehsan Nabipur<sup>3</sup>,  
Alireza Tafazoli<sup>4,5</sup>,  
Abouzar Bagheri<sup>6</sup>

<sup>1</sup> MSc of Medical Biochemistry, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> MSc Student in Medical Biochemistry, Department of Biochemistry-Biophysics and Genetics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> MSc of Biochemistry, Department of biochemistry-genetic and plant biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

<sup>4</sup> MSc of Mmedical Genetics, Department of Biochemistry, Biophysics and Genetics, Medical Faculty, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry-Biophysics and Genetics, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 4, 2017 ; Accepted June 18, 2018)

### **Abstract**

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate the expression of about 60% of human genomes. Silibinin or mixture of silybin A and B is a flavonolignans that constitute 70-80% Silymarin which is considered to be its main effective ingredient. Silibinin revealed antioxidant and anti-inflammatory effects by scavenging free radicals, improving antioxidant enzymatic activities, and suppressing NF- $\kappa$ B activation. One of the recent discoveries about the functions of silibinin, is its ability to change different miRNAs expression, especially in cancer. For instance, silibinin decreases Bcl<sub>2</sub> level by inhibiting miR-21 expression in breast cancer cells that leads to apoptosis. Silibinin elevates miR-203 expression in lung cancer cells that causes stimulation of E-cadherin. The component can differentiate mesenchymal phenotype to epithelial. Also, treatment of glioblastoma cancer cells with silibinin diminishes anti-apoptosis factor XIAP by upregulation of miR-7 that causes prevention of autophagia in these cells. Therefore, silibinin could induce apoptosis and differentiation and inhibit proliferation in different cancer cells via regulation of various miRNAs expression. In this review study we aimed to summarize the studies about the effects of silibinin on different miRNAs expression in various types of cancer cells to distinguish the exact mechanism of silibinin anti-cancer effects.

**Keywords:** silibinin, miRNA, cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (165):213-229 (Persian).

\* Corresponding Author: Abouzar Bagheri- Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: a.bagherimg@gmail.com)

# مروری بر اثرات سیلیبیین بر روی بیان miRNA های مختلف در سرطان

وحید اکبری کردخیلی<sup>۱</sup>

ستاره زرپو<sup>۲</sup>

احسان نبی پور<sup>۳</sup>

علیرضا تفضلی<sup>۴</sup>

ابوذر باقری<sup>۵</sup>

## چکیده

میکرو RNA ها (miRNAs)، RNA های غیر کد کننده‌ای هستند که توانایی تنظیم بیان حدود ۶۰ درصد ژن های ژنوم انسان را دارند. سیلیبیین فلاونولیکگناتی است که ۸۰-۷۰ درصد از سلیمارین را تشکیل داده و ماده موثره اصلی آن می باشد. گزارش شده است که سیلیبیین از طریق جمع آوری رادیکال های آزاد، افزایش بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی و مهار فاکتور رونویسی التهابی NF-κB باعث بروز خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می شود. یکی از جدیدترین اثرات کشف شده سیلیبیین، توانایی آن در تغییر بیان miRNA های مختلف به خصوص در سرطان می باشد. برای مثال سیلیبیین با کاهش بیان miR-21 در سلول های سرطانی سینه باعث مهار بیان Bcl2 و به دنبال آن تحریک آپوپتوز می شود. سیلیبیین با افزایش بیان miR-203 در سلول های سرطانی ریه منجر به افزایش E-cadherin می شود که تمایز به سلول های اپیتلیالی را به دنبال دارد. هم چنین درمان سلول های سرطانی گلیوبلاستوما با سیلیبیین، باعث مهار فاکتور ضد آپوپتوزی XIAP از طریق ارتقا بیان miR-7 شده و منجر به مهار فرآیند اتوفاژی در این سلول ها می گردد. بدین ترتیب سیلیبیین قادر به تحریک آپوپتوز، مهار تکثیر سلولی و افزایش تمایز در سلول های سرطانی از طریق تنظیم بیان miRNA های مختلف می گردد. با توجه به نقش بسیار مهم miRNA ها در فرآیندهای متنوع سلولی و مولکولی، در این مطالعه به جمع بندی و مرور مطالعات انجام شده در مورد اثرات سیلیبیین بر بیان miRNA ها در سرطان های گوناگون پرداخته شده است.

واژه های کلیدی: سیلیبیین، miRNA، سرطان

## مقدمه

درون زاد با حدود ۲۵-۱۸ نوکلئوتید هستند که توانایی تنظیم بیان حدود ۶۰ درصد از کل ژنوم انسان را دارند (۱). نقش تنظیمی miRNA ها در بسیاری از فرایندها مثل: رشد، تمایز، التهاب، سرطان، مقاومت دارویی و دیابت به اثبات رسیده است (جدول شماره ۱). برای مثال miR-9 با هدف قرار دادن NF-κB در مونوسیت ها و نوتروفیل ها

یکی از جدیدترین مکانیسم های تنظیم بیان ژن در فرایندهای مختلف سلولی به خصوص سرطان، میکرو RNA ها (miRNAها) هستند که در کنار میتاسیون DNA و استیلایسون هیستون ها به عنوان مکانیسم های اپی ژنتیک معرفی شده اند و در تنظیم بیان ژن ها نقش مهمی برعهده دارند. miRNAها، RNA های غیر کد کننده

E-mail: a.baghering@gmail.com

مؤلف مسئول: ابوذر باقری - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع انشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکد پزشکی

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۳. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
  ۴. کارشناسی ارشد ژنتیک مامایی، گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۵. مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
  ۶. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، بیوفیزیک و ژنتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و سلولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۲/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۵/۲۳

جدول شماره ۱: جدیدترین یافته ها در مورد نقش miRNA های مختلف در شرایط گوناگون

miRNA	نمونه	افزایش/کاهش بیان	miRNA سیرهای هدف	درفنس
oncomiR-146b	سلول های اپیتلیال تروئیدی	افزایش	PTEN	۲
tumor suppressor miRNA-6822	سلول های سرطان گردن رحم	افزایش	PI3K/AKT با هدف قرار دادن FoxM1	۳
oncomiR-200 family	سلول های سرطان معده و موش های gp130/F	افزایش	STAT3	۴
tumor suppressor miR-124	سلول های سرطان پروستات رده DU145	کاهش	مهار متاستاز و تکثیر با هدف قرار دادن STAT3	۵
tumor suppressor miR-466	سلول های سرطان پروستات انسانی	کاهش	مهار رشد تومور پروستات و متاستاز استخوان با هدف قرار دادن فاکتور رونویسی استخوان RUNX2	۶
oncomiR-137	سرطان سلول های غیر کوچک ریه	افزایش	افزایش گسترش تومور از طریق سرکوب TFAP2C	۷
oncomiR-103	سلول های سرطان کولورکتال	افزایش	افزایش گسترش تومور با هدف قرار دادن ZO-1	۸
anti-inflammatory miR-22	موش های دچار خونریزی ساب آر کونید	کاهش	افزایش IL-6 و Cyt61 و سرکوب caspase 3 و Bax	۹
anti-inflammatory miR-146a	نقره پاتی دبابی	کاهش	باعث مهار التهاب از طریق سرکوب Nox4، تولید ROS، VCAM 1 و ICAM 1 شد	۱۰
miR-221	سلول های سرطان ریه مقاوم به سیس پلاتین	افزایش	افزایش مقاومت دارویی از طریق تحریک مسیر PTEN/Akt	۱۱
miR-455-3p	سلول های سرطان پانکراس	کاهش	مهار مقاومت دارویی با هدف قرار دادن TAZ	۱۲
miR-320c miR-1225-5p	موشهای دبابی	افزایش	افزایش این دو miRNA قبل از افزایش گلوتکز طی دیابت بوده است	۱۳
miR-19b	موش های apoE <sup>-/-</sup>	افزایش	تحریک آترواسکلروزیس از طریق التهاب بافت چربی اطراف عروق	۱۴

miR-17/92 در سرطان ریه افزایش بیان داشته و با مورد هدف قرار دادن HIF1 $\alpha$  باعث پیشرفت تومور می گردد (۲۳). به طور کلی در انواع سرطان ها، بیان miRNA های سرکوب کننده سرطان کاهش و بیان miRNA های آنکوژن افزایش می یابد که نتیجه آن افزایش رشد، تکثیر و متاستاز تومور می باشد. بنابراین بازگردانی بیان miRNA های سرکوب کننده سرطان با استفاده از مقلدهای miRNA<sup>۳</sup> و سرکوب بیان miRNA های آنکوژن با استفاده از Antagomir<sup>۴</sup> ها و عوامل اپی ژنتیکی مثل متیلاسیون پروموتور می تواند مانع از پیشروی سرطان شود. علت عملکرد نادرست miRNA ها در سلول های سرطانی می تواند جهش، تغییرات اپی ژنتیک، حذف ژنومی یا تغییر در پردازش miRNA ها باشد (۱۸، ۲۴).

در پژوهش های مختلفی اثبات شده است که ترکیبات طبیعی مختلف مثل کورکومین، زروراترول، پلی فنل ها، کوئرستین و سیلیبین قادرند روی بیان miRNA ها تاثیر بگذارند و از این طریق اثرات حمایتی در فرآیندهای بیولوژی مختلف به خصوص سرطان از خود به جا بگذارند (۲۷-۲۵). سیلیبین ۷۰-۸۰ درصد از عصاره دانه گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) را تشکیل می دهد و از دیرباز به عنوان حمایت کننده کبد در شرایط بالینی مختلف مثل مسمومیت و کبد چرب شناخته شده می باشد (۲۸). سیلیبین یا ترکیب سیلیبین A و B (تصویر

باعث کاهش پاسخ التهابی می شود (۱۵). خانواده miR-34 در القاء تمایز و توقف چرخه سلولی از طریق کاهش cyclin D1، cyclin E2، CDK4، CDK6، و CDC25A نقش دارند (۱۶) miR-494 از طریق کاهش BIM<sup>۱</sup> در NSCLC<sup>۲</sup> باعث مقاومت در برابر داروی ضد سرطانی TRAIL می شود (۱۷). اما به دلیل این که بیش از ۵۰ درصد از ژن های miRNA ها در مکان هایی در ارتباط با ژن های مرتبط با سرطان قرار دارند، نقش miRNA ها در جنبه های مختلف سرطان مثل: پیش گیری، تشخیص و درمان بیش تر مورد توجه می باشد (۱۸، ۱۹). اهمیت miRNA ها در سرطان اولین بار در لوسمی CLL نشان داده شد. مطالعات سیتوژنتیکی نشان داد که ناحیه کروموزومی 13q14 در ۵۰ درصد بیماران مبتلا به CLL حذف می شود. مطالعات بعدی مشخص کرد که این ناحیه حاوی دو ژن کد کننده miR-16-1 و miR-15a است که به صورت پلی سیسترونیک رونویسی می شوند (۲۰). در سال های اخیر، شناسایی و تعیین نقش miRNA های سرکوب کننده سرطان (Tumor suppressor miRNA) و سرطانزا یا آنکوژن (oncomiR) در ایجاد تومور از اهداف پیشتاز پژوهشگران بوده است. در همین راستا مشخص شده است که miR-15/16 با هدف قرار دادن پروتئین ضد آپوپتوزی BCL2 در لوسمی لنفوئیدی مزمن و COX-2 در سرطان کولون در مهار سرطان نقش دارد (۲۱، ۲۲).

3. miRNA-mimic  
4. miRNA antagonists

1. Bcl2-interacting mediator of cell death  
2. Non-small cell lung carcinoma

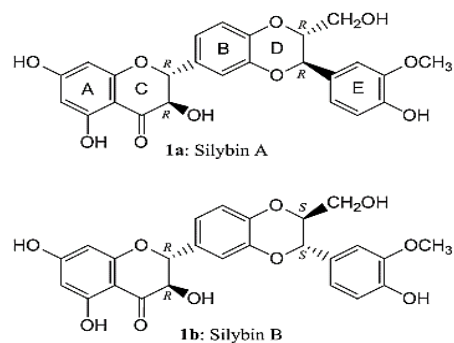
## معیارهای ورود و خروج از مطالعه

مقالات چاپ شده غیر انگلیسی و فارسی، مقالات تکراری، مقالات مروری، انواع خلاصه مقالات و کنفرانس ها حذف گردیدند. پس از استخراج مطالعات بر اساس وجود کلیدواژه‌ها در عنوان و خلاصه مقاله، متن کامل مقالات به دقت مورد بررسی قرار گرفته و اطلاعات مورد نیاز به طور دقیق جمع آوری گردید.

## بیوژنز و نامگذاری miRNA ها

بیش از نیمی از miRNA ها دارای ناحیه پرموتر ویژه بوده و به صورت مستقل بیان می‌شوند. بخش دیگر miRNA ها در میان نواحی اینترونی و اگزونی کدکننده پروتئین‌ها در ژنوم پراکنده‌اند که نمایانگر نقش تعاملی miRNA ها با پروتئین‌های مربوطه می‌باشد (۳۳). سنتز miRNA ها از رونوشت‌های سنجاق سری شکل درون‌زاد مشتق می‌شوند و طی مراحل گوناگون، به بلوغ می‌رسند. بیوژنز آن‌ها با تشکیل یک رونوشت اولیه (pri-miRNA) که اغلب شامل صدها نوکلئوتید و ساختارهای ساقه-حلقه بوده، آغاز می‌گردد. اکثر این پیش‌سازها توسط آنزیم RNA پلی‌مراز II تشکیل می‌شوند. رونوشت اولیه miRNA ها در هسته توسط یک آنزیم RNaseIII به نام دروشا به صورت یک ساختار سنجاق سری کوچک بریده می‌شود (۳۴). این فرآیند نیاز به همکاری پروتئین واجد ناحیه متصل شونده به RNA دو رشته‌ای (dsRBD) به نام DGCR8 دارد. DGCR8 در کنار آنزیم دروشا تشکیل یک کمپلکس پروتئینی به نام Micro processor را می‌دهد که وظیفه برش رونوشت اولیه و تبدیل آن به یک رشته تقریباً ۷۰ نوکلئوتیدی دارای ساختار ناقص ساقه و حلقه (pre-miRNA) را به عهده دارد (۳۵). مطالعات گوناگون نشان داده‌اند که کارایی آنزیم دروشا بستگی به اندازه حلقه انتهایی، ساختار ساقه مانند و توالی‌های آویزان موجود در محل برش دارد (۳۶). در مرحله بعد پروتئین Exportin 5 که وابسته به RAN-GTP می‌باشد، pre-miRNA را به

شماره ۱) فلاونولینگنانی است که ۷۰-۸۰ درصد از سیلیمارین را تشکیل داده و ماده موثره اصلی آن می‌باشد (۲۹). گزارش شده‌است که سیلیبینین از طریق جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث ارتقاء ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن در شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۰). سیلیبینین قادر است از طریق مهار NF- $\kappa$ B از التهاب جلوگیری کند (۳۱). هم‌چنین اثرات ضد سرطانی سیلیبینین از طریق القای آپوپتوز و مهار فاکتورهای رشد به اثبات رسیده‌است (۳۲). یکی از جدیدترین اثرات کشف شده سیلیبینین، توانایی آن در تغییر بیان miRNA های مختلف در سلول‌های گوناگون می‌باشد. از این طریق سیلیبینین توانسته است اثرات مفید قابل توجهی به خصوص در مبحث سرطان نشان دهد. هدف از این مطالعه جمع‌بندی و مرور مطالعات انجام شده در مورد اثرات سیلیبینین بر بیان miRNA ها در سلول‌های سرطانی مختلف می‌باشد.



تصویر شماره ۱: ساختار سیلیبینین، ترکیب سیلیبین A و B

## مواد و روش‌ها

## نحوه جستجو

در این مطالعه از کلیدواژه‌های silibinin، neoplasm tumor، miRNA، microRNA، silymarin و cancer استفاده شده و مقالات مربوطه از پایگاه‌های معتبر PubMed، Scopus، Google Scholar و Web of Science بدون محدودیت زمانی استخراج شده‌اند.

عبارت‌های 5p و 3p برای تعیین منشا miRNA از بخش 5' یا 3' miRNA اولیه استفاده می‌شود (۴۲).

#### تنظیم بیان ژن‌ها توسط miRNA ها

از ویژگی‌های miRNA ها تنظیم ترکیبی می‌باشد. به گونه‌ای که یک miRNA ممکن است صدها RNA هدف مختلف داشته باشد و یک مولکول هدف توسط چندین miRNA تنظیم گردد. یکی از مهم‌ترین مباحث مربوط به miRNA ها، شناسایی mRNA های هدف است. miRNA ها از طریق توالی ۸-۲ نوکلئوتیدی موجود در قسمت 5' خود (seed sequence) با نواحی مکمل در RNA هدف کمپلکس‌های لازم برای جلوگیری از ترجمه یا تجزیه RNA را ایجاد می‌نمایند. بروز جهش در توالی seed موجب عدم شناسایی mRNA هدف می‌شود. در خارج از این ناحیه، اتصال miRNA با mRNA معمولاً به طور کامل صورت نمی‌گیرد. به این دلیل miRISC mRNA هدف را برش نمی‌دهد و تنها مانع از ترجمه آن می‌گردد (مکانیسم غالب در جانوران). اما اگر mRNA هدف به طور کامل با miRNA مکمل باشد، mRNA بدون آدنیل شده و توسط برش اندونوکلازای ناپایدار و سپس تجزیه می‌شود (مکانیسم غالب در گیاهان) (۴۳). خروجی عملکردی تعامل miRNA-mRNA می‌تواند تحت تاثیر عواملی که قدرت پیوند miRNA-mRNA را تغییر می‌دهند، قرار گیرد، برای مثال وجود چندین مکان اتصال برای یک miRNA مشخص در mRNA هدف و جایگاه‌های مشابه آن‌ها، وجود توالی‌های جانبی آویزان در محل اتصال miRNA، ساختارهای ثانویه mRNA ها و میزان دسترسی miRNA به مکان اتصال (۴۴). خاموش سازی ژن به وسیله miRNA در سه مرحله قبل از ترجمه، همزمان با ترجمه و پس از ترجمه می‌تواند رخ دهد. در خاموش سازی قبل از ترجمه، تک رشته بالغ miRNA در یک کمپلکس پروتئینی که شباهت زیادی با RISC دارد، به نام miRNP قرار می‌گیرد. در مواردی

سیتوپلاسم منتقل می‌کند. در سیتوپلاسم یک مولکول RNaseIII دیگر به نام Dicer به همراه یک پروتئین dsRBD دیگر به نام TRBP، pre-miRNA را در محل سنجاق سر بریده و آن را به یک RNA دو رشته‌ای کوچک (dsRNA) که شامل رشته بالغ miRNA و رشته مکمل آن می‌باشد، تبدیل می‌نماید. TRBP سبب فراخوانی پروتئین دیگری به نام آرگونات<sup>۱</sup> می‌گردد. این پروتئین به عنوان فاکتور اصلی کمپلکس خاموش سازی القا شده توسط RNA (RISC) می‌باشد و در صورت بروز جهش در این ژن، miRNA ها قادر به هیچگونه عملکردی نیستند (۳۸،۳۷). کمپلکس RISC، رشته مولکول RNA ای که انتهای 5' ناپایدارتری دارد (به طور معمول حاوی یوراسیل می‌باشد) را جذب می‌کند. رشته مکمل معمولاً (اما نه در همه موجودات) تجزیه می‌گردد. با این حال برخی از miRNA های یافت شده در انسان و موش همان رشته مکمل هستند (۳۹). هر یک از رشته‌های pre-miRNA می‌توانند مختص به یک نوع بافت ویژه باشند. به عنوان مثال miR-30e-3p در سمت بازوی 3' و miR-30e-5p در سمت بازوی 5' به ترتیب، بیش‌تر در معده و طحال بیان می‌گردند (۴۰،۴۱). پس از این RISC حاوی تک رشته miRNA بالغ (miRISC) به عنوان یک کمپلکس کاتالایتیک به سمت mRNA هدف حرکت نموده و سبب جلوگیری از ترجمه آن به پروتئین مربوطه می‌گردد. با شناسایی تعداد زیادی از miRNA ها، تعیین سامانه مشخص جهت نامگذاری آن‌ها ضروری شده است. بر این اساس به هر یک از miRNA ها یک عدد حداکثر سه رقمی تعلق می‌گیرد. در صورتی که از یک miRNA خاص دو نسخه یکسان در دو لکوس مختلف ژنوم وجود داشته باشد، از پسوند عددی استفاده می‌شود. برای مثال miR-6-1 و miR-6-2 در مگس سرکه. اگر اختلاف توالی دو miRNA در حد یک یا دو نوکلئوتید باشد از پسوند الفبایی استفاده می‌شود، برای مثال miR181a و miR181b در موش. از

1. Argonaute

نقش بازدارندگی، می‌توانند از طریق ترکیب با پروتئین‌های اختصاصی در کمپلکس miRNP ها، باعث تحریک بیان ژن‌های خاصی شوند (تنظیم مثبت<sup>۲</sup>). در مورد این رفتار تنظیمی miRNA ها، مکانیسم‌های گوناگونی پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به سه مورد از مهم‌ترین مکانیسم‌ها اشاره کرد: ۱- اتصال miRNA به توالی‌های غنی از پورین اختصاصی در DNA دو رشته‌ای و ایجاد یک کمپلکس سه تایی (Triplex) و تغییر در ساختار فضایی DNA که خود منجر به تغییر دسترسی فاکتورهای رونویسی به آن ژن می‌گردد. ۲- اتصال miRNA به توالی‌های ویژه موجود در پروموتور ژن‌ها و تغییر حالت متیلاسیون آن‌ها از طریق فراخوانی آنزیم‌های ویژه متیلاسیون. ۳- سرکوب ژن‌های مهارکننده بیان دیگر ژن‌ها و در نتیجه تاثیر مثبت بر بیان ژن‌هایی که تحت تنظیم ژن‌های مهارنده بوده‌اند (۴۹، ۵۰). برخی miRNA ها با توجه به نوع سلول، هم به عنوان محرک و هم به عنوان سرکوب کننده بیان ژن عمل می‌کنند. به عنوان مثال miR-145 باعث تحریک بیان ژن میوکاردين طی تمایز ماهیچه شده در حالی که باعث مهار بیان ROCK1 در استئوسارکوما می‌گردد (۵۱، ۵۲).

#### سیلیبیین

ترکیبات مختلفی مثل سیلیبین A و B، سیلیکریستین، سیلیدیانین، تاکسیفولین و کوئرستین از سیلیبیمارین جداسازی شده‌اند. اما همانطور که گفته شد، سیلیبیین 3-(2R,3R)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl]chroman-4-one ماده موثره اصلی سیلیبیمارین می‌باشد. سیلیبیین به دلیل ساختار چند حلقه‌ای و غیر قابل یونیزاسیون، حلالیت بسیار کمی در آب (۰/۵ g/L) و حلالیت نسبی در حلال‌های آلی مثل اتانول (0.1 mg/ml)، DMSO (10 mg/ml) و دی‌متیل فرماید (20 mg/ml) دارد (۵۳-۵۶). به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی اثبات شده این حلال‌های

که miRNA با هدف خود کاملاً مکمل باشد، mRNA هدف در محل جفت شدن با نوکلئوتیدهای ۱۰ و ۱۱ miRNA با استفاده از آنزیم‌هایی مثل decapping، deadenylase، اندو و اگزو نوکلئاز برش خورده و تجزیه می‌شود. در اکثر موارد miRNA ها با mRNA هدف خود به طور کامل جفت نیستند. در این شرایط آرگونوات در کمپلکس miRNP-mRNA با فاکتور eIF4E در اتصال به انتهای 5' mRNA رقابت می‌کند و از این طریق باعث مهار شروع ترجمه می‌شود (۴۵). هم‌چنین miRNP قادر به جلوگیری از اتصال زیرواحدهای ریبوزوم و شروع ترجمه می‌شود. در فرآیند پس از شروع ترجمه، آرگونوات از طریق جمع‌آوری فاکتور eIF6 از اتصال زیرواحد بزرگ ریبوزوم به mRNA و ادامه ترجمه جلوگیری می‌کند (۴۶). علاوه بر این، miRNP می‌تواند از طریق تداخل با فاکتورهای طویل سازی باعث پایان زودرس ترجمه شود. در این حالت پلی‌زوم موجود بر روی mRNA نیز متلاشی شده و پپتید ناقص سنتز شده، تجزیه می‌گردد. در فرآیند پس از ترجمه نیز پلی‌پپتید در کمپلکس‌های پروتئازی تجزیه می‌شود. پس از مهار ترجمه، کمپلکس miRNP به سمت اجسام پردازشی<sup>۱</sup> هدایت می‌شوند. نشان داده شده است که mRNA ها بعد از انتقال به اجسام پردازشی، می‌توانند تجزیه هم بشوند که البته محل برش در این حالت متفاوت از حالت جفت شدن کامل با miRNA در کمپلکس miRISC است. در اغلب موارد mRNA درون اجسام پردازشی موقتاً ذخیره و بعداً بیرون آمده و ترجمه از سر گرفته می‌شود. میزان ترجمه مجدد یا تجزیه mRNA به تعادل دینامیکی پلی‌زوم‌ها و miRNP ها در اجسام پردازشی بستگی دارد (۴۷). برخی مطالعات نشان دادند که miRNA به صورت کمپلکس با آرگونوات هسته‌ای (Ago) با تغییر ساختار کروماتین باعث مهار رونویسی ژن نیز می‌شود (۴۸). در بعضی از مطالعات مشخص گشته است که miRNA ها علاوه بر

2. up regulation

1. Processing body

BCRP<sup>1</sup> حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطانی را افزایش می‌دهد (۶۰). البته اثرات دیگری مثل ضد دیابتی و ضد میکروبی نیز از سیلیبینین گزارش شده است (۶۱، ۶۲). یکی از جدیدترین اثرات کشف شده سیلیبینین، توانایی آن‌ها در تغییر بیان miRNA ها می‌باشد (جدول شماره ۲). از این طریق سیلیبینین قادر است اثرات مفید قابل توجهی در شرایط بالینی مختلف به خصوص سرطان از خود نشان بدهد.

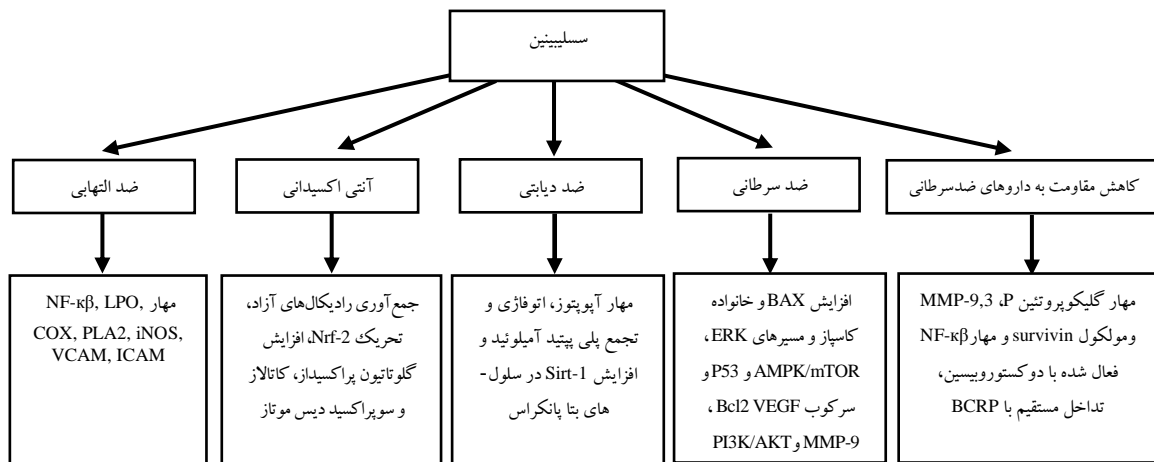
#### سرطان سینه

MiR-21 به عنوان یک آنکو-میر MiR-21 (oncomiR=oncogenic miRNA) شناخته شده می‌باشد و بیشترین افزایش را نسبت به سایر آنکو-میرها در بافت ریه طی سرطان دارد. مشخص شده است که بیان miR-21 در سرطان سینه  $Era^{+2}$  افزایش چشمگیرتری نسبت به  $Era^{-}$  دارد و باعث کاهش سرکوب کننده‌های تومور مثل PTEN، PDCD4 و TM1 می‌گردد (۶۳-۶۵). در تحقیقات نشان داده شده است که سیلیبینین می‌تواند از طریق افزایش PTEN (یکی از محرک‌های آپوپتوز و توقف چرخه سلولی) و کاهش پروتئین ضد آپوپتوز Bcl<sub>2</sub> و miR-21 باعث القای آپوپتوز و توقف چرخه تقسیم سلولی در سلول‌های سرطان سینه شود (۶۶). در همین راستا جهان فروز و همکاران مشخص کردند که انکو-بایون سلول‌های سرطان سینه رده‌های MCF-7 و T47D با سیلیبینین  $150 \mu M$ ، باعث کاهش بیان miR-21 می‌رود، که با افزایش PTEN در سلول‌های MCF-7 و کاهش Bcl<sub>2</sub> در هر دو رده همراه بوده است. PTEN از طریق مهار مسیر پیام رسانی AKT/PKB و تاثیر منفی بر تقسیم سلولی به عنوان یک سرکوب کننده تومور مطرح بوده و جهش در آن در بسیاری از سرطان‌ها دیده شده است. بدین ترتیب سیلیبینین با مهار بیان miR-21 اثرات مطلوبی در سرکوب تومور از خود به جا گذاشته است (۶۷). افزایش بیان miR-181a در سلول‌های سرطانی کولون،

آلی و تداخل اثرات آن‌ها با سیلیبینین، سیستم‌های انتقال داروی زیادی طراحی شده است، مثل سیلیبینین دی هیدروژن سوکسینات (Legalone)، سیلیبینین فسفاتیدیل کولین (siliphos) و نانو کمپلکس‌های سیلیبینین که دسترسی زیستی سیلیبینین را تا اندازه قابل توجهی افزایش می‌دهند. از آنجایی که حلالیت سیلیبینین در لیپیدها کم می‌باشد، گذر آن از غشای سلول‌های روده محدود بوده و در نتیجه جذب روده‌ای کمی (حدود ۳۰-۲۰ درصد) دارد. پس از جذب در حدود ۸۰-۷۰ درصد سیلیبینین به سرعت به گلوکوکورونید متصل شده و از طریق سیستم صفراوی دفع می‌شود. از این رو غلظت خونی آن بسیار پایین است و این می‌تواند یکی از علل عوارض جانبی سیستمی کم آن باشد. بیش از ۹۰ درصد سیلیبینین در پلاسما به حالت کونژوگه با سولفات و گلوکوکورونید می‌باشد. اما در برخی از بیماری‌های کبدی و کلیوی، غلظت فرم آزاد (فعال) سیلیبینین در خون افزایش می‌یابد (۵۷). اثرات حمایتی سیلیبینین در شرایط بالینی مختلف مثل استرس اکسیداتیو، سرطان، التهاب، بیماری‌های عفونی و مسمومیت در بافت‌های متعدد به اثبات رسیده است (تصویر شماره ۲).

سیلیبینین با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد به خصوص از طریق باندهای دوگانه حلقه C، افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیس موتاز و گلوکوتایون پراکسیداز و تحریک فاکتور رونویسی آنتی‌اکسیدانی Nrf-2 باعث افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود. هم چنین سیلیبینین با کاهش تجزیه  $iK-\beta$  و آنزیم‌های COX-2، PLA2 و iNOS در مهار مازاد پاسخ التهابی نقش دارد (۵۸، ۵۹). اثرات ضد سرطانی سیلیبینین نیز از طریق افزایش پروتئین‌های آپوپتوزی مثل BAX و خانواده CASPASE، تحریک سرکوب کننده تومور P53 و کاهش پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl<sub>2</sub> و فاکتورهای آنژیوژنر مثل VEGF و angiopoietin-2 می‌باشد (۱۹). سیلیبینین / سیلیبینین از طریق مهار گلیکوپروتئین P-

1. Breast cancer resistance protein  
2. Estrogen receptor alpha



تصویر شماره ۲: اثرات مختلف سیلیبیین و مکانیسم آن‌ها

جدول شماره ۲: اثرات سیلیبیین روی miRNA های مختلف و مسیرهای هدف آن‌ها

درمان	نمونه	افزایش/کاهش بیان miRNA	miRNA مسیرهای هدف
سیلیبیین ۱۵۰ μM	سلول‌های سرطان سینه رده‌های T47D و MCF-7	کاهش بیان miR-21	مهار تکثیر و تحریک آپوپتوز از طریق افزایش PTEN و کاهش Bcl2
سیلیبیین ۲۴ μM	سلول‌های سرطان سینه رده SK-BR-3	کاهش بیان miR-181a	مهار تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز
سیلیبیین ۱۰۰ μg/ml	سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7	کاهش بیان miR-155 و miR-21	افزایش آپوپتوز با افزایش caspase-9, P53, BID و APAF-1
کمپلکس سیلیبیین با نانونیوزومال کت شده با TMC	سلول‌های سرطان سینه رده T47D	کاهش بیان miR-141, miR-15a, miR-21 و miRT-21	افزایش آپوپتوز و کاهش ماندگاری سلول‌های سرطانی
تزریق دهانی سیلیبیین-مگلوبین ۱۰۰ mg/kg پنج بار در هفته به مدت ۳۵ روز	رت‌های دچار پیوند سلول‌های NSCLC مقاوم به داروی erlotinib	کاهش بیان miR-21 و miR-200c	مهار تبدیل اپیتالی به مزانشیمی (EMT) با کاهش SNAIL1 و ZEB1
سیلمارین در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰ μg/ml	سلول‌های NSCLC رده H460 و H1299, A549	افزایش بیان miR-203	مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی و رشد تومور با کاهش سطح 2 و 3 HDAC1 و ZEB1 و افزایش E-cadherin
سیلیبیین ۵۰ μM	سلول‌های سرطان گلیوبلاستوما رده T98G و U87MG	افزایش بیان miR-7-1-3p, miR-9, miR-181a	مهار اتوفاژی و تحریک آپوپتوز از طریق هدف قرار دادن XIAP
سیلیبیین ۱۳۵ μM	سلول‌های کارسینوما اوروتیال مانه رده RT4 و T24	کاهش بیان miR-100 و miR-203	کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی با کاهش AKT2, mTOR و FRAP
سیلیبیین در دوزهای ۲۰۰-۵۰	سلول‌های کارسینوما اسکروآئوس سر و گردن	افزایش بیان miR-494	مهار سلول‌های سرطانی با هدف قرار دادن Bmi1 و ADAM10
سیلیبیین کمپلکس با ذرات نانو chitosan در دوز ۵۰ μM	سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)	افزایش بیان pre-miR-20b و pre-miR-410	افزایش تمایز به سلول‌های استخوان ساز با فعالسازی مسیر BMP/SMAD/RUNX2
		کاهش بیان pre-miR-221 و pre-miR-30c-1	

که بیان miR-21 در بیماران مبتلا به سرطان سینه سه برابر بیش تر از افراد غیر سرطانی می‌باشد (۷۱). هم‌چنین miR-155 سرکوب‌کننده‌های تومور مثل SOCS-1 و RAD-51 را مهار می‌کند و از این طریق باعث رشد تومور و مهار ترمیم DNA می‌گردد (۷۲). در همین راستا ملکی زاده و همکاران نشان دادند که سیلیبیین ۱۰۰ μg/ml بیان miR-155 و miR-21 را به طور چشمگیری در سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 کاهش می‌دهد. در این پژوهش بیان caspase-9, P53, BID و APAF-1 به عنوان mRNA های هدف miR-21 و miR-155، طی درمان با سیلیبیین افزایش یافت (۶۶). Caspase-9, APAF-1 و BID در فرآیند آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری و تشکیل کمپلکس آپوپتوز نقش دارند.

با افزایش تکثیر سلولی از طریق تحریک فرآیند گلیکولیز همراه می‌باشد (۶۸). هم‌چنین نشان داده شده است که miR-181a باعث تحریک متاستاز در سلول‌های سرطانی کبد با واسطه Osteopontin می‌گردد (۶۹). در همین راستا شاهین‌فر و همکاران اثبات کردند که انکوباسیون سلول‌های سرطان سینه رده SK-BR-3 با سیلیبیین، منجر به کاهش بیان miR-181a، مهار تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز می‌شود. به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های اثرات ضدسرطانی سیلیبیین در این سلول‌ها مهار بیان miR-181a باشد (۷۰). همان‌طور که گفته شد، miR-21 در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه افزایش بیان داشته و در پیشرفت تومور نقش موثری را ایفا می‌نماید. در مطالعه‌ی نشان داده شد

می‌کند سلول‌های مزانشیمی مقاومت بیش‌تری نسبت به سلول‌های اپیتلیالی به داروهای ضدسرطانی از خود نشان می‌دهند (۷۷). در همین راستا Cufi و همکاران نشان دادند که مصرف خوراکی سیلیبینین به مدت ۳۵ روز به طور چشمگیری حجم تومور را در رت‌های دچار پیوند سلول‌های NSCLC مقاوم به داروی erlotinib کاهش می‌دهد. هم‌چنین سیلیبینین حساسیت این سلول‌ها را به erlotinib افزایش می‌دهد. در این پژوهش مشخص شد که در سلول‌های NSCLC مقاوم به داروی erlotinib بیان miRNA های مرتبط با EMT<sup>۲</sup> (انتقال اپیتلیال به مزانشیمال) مثل miR-21 و miR-200c به‌طور چشمگیری به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد. تجویز خوراکی و سیستمی سیلیبینین توانسته بیان این miRNA ها را در این سلول‌ها کاملاً معکوس کند. سیلیبینین هم‌چنین باعث کاهش بیان مارکرهای مربوط به EMT شامل: ZEB1 (مهارکننده رونویسی اپیتلیالی)، SNAIL1 (تحریک کننده EMT) و N-cadherin (مولکول چسبنده سطحی مزانشیمی) در سلول‌های NSCLC مقاوم به erlotinib می‌گردد (۷۸). نشان داده شده است که miR-21 قادر به افزایش بیان ژن تحریک کننده EMT یعنی SNAIL می‌باشد (۷۹). هم‌چنین با توجه به مطالعات گذشته، miR-200c بیان مهار کننده‌های رونویسی اپیتلیالی ZEB1 و ZEB2 را مورد هدف قرار می‌دهد (۸۰). بدین ترتیب به نظر می‌رسد که سیلیبینین با تنظیم بیان miRNA ها موجب مهار تبدیل فنوتایپ اپیتلیالی به مزانشیمی و افزایش حساسیت به داروی erlotinib در سلول‌های NSCLC شده است. miR-203 به عنوان miRNA مختص پوست دسته بندی می‌شود که در تمایز اپیدرمی نقش دارد. miR-203 البته در بافت‌های اپیتلیوم اسکواموس گردن رحم و مری نیز بیان می‌شود و در سرطان‌های مختلف به عنوان سرکوب کننده تومور عمل می‌کند. گزارش شده است که بیان آن در سرطان ریه کاهش می‌یابد، هم‌چنین در سرطان کولورکتال بیان

P53 نیز یک سرکوب کننده شناخته شده سرطان می‌باشد که بیان بسیاری از پروتئین‌های آپوپتوزی را تحریک می‌نماید (۷۳). در نتیجه سیلیبینین با مهار بیان آنکو میرها باعث مهار تکثیر و رشد تومور می‌گردد. در سرطان‌های مختلف، miR-15a به عنوان یک سرکوب کننده تومور شناخته شده است که قادر به تحریک آپوپتوز و محدود کردن رشد تومور می‌باشد. در چندین مطالعه گزارش شده که بیان miR-15a در سرطان سینه کاهش می‌یابد (۷۴). هم‌چنین miR-141 و miR-200c عضو از خانواده miR-200 بوده که عملکرد سرکوب کنندگی تومور دارند و بررسی‌ها نشان داده است که طی سرطان سینه کاهش می‌یابند (۷۵).

یزدی و همکاران تاثیر سیلیبینین آزاد و کمپلکس با نانونیوزومال کت شده با trimethyl chitosan (TMC) را بر روی بیان miRNA های مختلف در سلول‌های رده T47D مورد ارزیابی قرار دادند. در پایان مشخص شد که هر دو فرم سیلیبینین باعث کاهش بیان miR-141، miR-15a و miR-21 و افزایش بیان miR-200c گشته که با افزایش آپوپتوز و کاهش ماندگاری سلول‌های سرطانی همراه بود. اما اثربخشی سیلیبینین TMC نسبت به سیلیبینین آزاد روی تنظیم miRNA ها موثرتر و بیش‌تر بود (۷۶). اما از آنجایی که در این مطالعه رشد تومور و متاستاز توسط سیلیبینین مهار شده است، در نتیجه به نظر می‌رسد که نقش miR-141 و miR-15a در رشد و متاستاز از اهمیت کم‌تری نسبت به miR-200c و miR-21 برخوردار است.

#### سرطان ریه

نقش سیلیبینین در کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای ضد سرطانی از طریق تنظیم بیان miRNA های دخیل در این مسیر مشخص شده است. شواهد روزافزونی دلالت بر نقش فنوتایپ مزانشیمی در مقاومت به داروهای ضد سرطانی erlotinib (مهارکننده EGFR<sup>۱</sup>) در سلول‌های NSCLC وجود دارد که تاکید

2. Epithelial to mesenchymal transition

1. Endothelial-driven growth factor receptor

جایی که اثربخشی سیلیسین روی miR-7 بیش تر بود، این پژوهشگران نشان دادند که تحریک بیان miR-7 با استفاده از مقلد miR-7 در موش های دچار پیوند سلول های U87MG و T98G اثرات ضدسرطانی سیلیسین را تقویت می نماید (۸۵).

#### سرطان مثانه

اثربخشی سیلیسین در سرطان مثانه نیز مورد بررسی قرار گرفته است. تنظیم بیان miRNA ها یکی از مهم ترین مکانیسم های عمل سیلیسین در این مبحث می باشد. miR-100 و miR-203 قادر به تحریک تکثیر و رشد سلولی از طریق مسیرهای PI3K-FRAP/mTOR و PI3K/AKT2 در سرطان های مثل سینه، تخمدان و مثانه می باشند (۸۶، ۸۷).

در پژوهش de Oliveira و همکاران، سیلیسین اثرات ضد سرطانی قابل توجهی بر روی سرطان مثانه از خود نشان داده است. آن ها مشخص کردند که انکوئاسیون سلول های سرطان اوروتلیال مثانه رده RT4 (دارای فرم رایج ژن P53) و T24 (دارای فرم جهش یافته ژن P53) با سیلیسین  $135-200 \mu\text{M}$  باعث کاهش بیان miR-100 و AKT2 و FRAP/mTOR و افزایش بیان miR-203 در سلول های RT4 و کاهش بیان miR-203 در T24 می گردد. بیش ترین اثر در دوز  $150 \mu\text{M}$  مشاهده شد. به نظر می رسد که با وجود اثرات ضدسرطانی سیلیسین در هر دو رده سلول های کارسینوما اوروتلیال مثانه، اثر آن بر miR-100، AKT2 و FRAP/mTOR وابسته به ژن P53 می باشد که در بلوغ miRNA ها نقش مهمی دارد (۸۸).

#### سرطان سر و گردن

miR-494 در سرطان های مختلف هم به عنوان سرکوب کننده تومور و هم آنکومیر عمل می کند. miR-494 در سرطان های مثل، ریه، پروستات و معده کاهش و در سرطان کولورکتال افزایش بیان دارد (۸۹).

آن توسط فاکتور تحریک کننده EMT یعنی ZEB مهار می شود (۸۱). ZEB1 مهار کننده اصلی بیان E-cadherin از طریق تجمع HDAC1<sup>۱</sup> و HDAC2 در سلول های سرطانی می باشد که در نهایت باعث بروز فنوتایپ مزانشیمی و تومورزایی می گردد. E-cadherin بر خلاف N-cadherin با افزایش چسبندگی سطحی در بافت اپیتلیالی از تومورزایی جلوگیری می کند (۸۲). در این راستا Singh و همکاران نشان دادند که درمان سلول های NSCLC رده A549، H1299 و H460 با سیلیسین در دوزهای  $5, 10$  و  $20 \mu\text{g/ml}$  منجر به افزایش بیان miR-203 به صورت وابسته به دوز شده که با کاهش سطح HDAC1-3 و ZEB1 و افزایش E-cadherin همراه بود (۸۳). بدین طریق سیلیسین مهاجرت سلول های سرطانی و رشد تومور را محدود مینماید.

#### گلیوبلاستوما

گلیوبلاستوما یکی از سرطان های است که تغییر بیان miRNA ها در آن مشهود است. با توجه به مطالعات انجام شده، افزایش بیان miR-7 با کاهش حجم تومور و متاستاز همراه است. هم چنین miR-7 با مهار EGFR و مسیر پیام رسانی Akt باعث تحریک آپوپتوز و تمایز در سلول های سرطان گلیوبلاستوما می گردد (۸۴). در پژوهش Chakrabarti و همکاران مشخص شد که miR-7 می تواند XIAP، یک فاکتور ضد آپوپتوز را مورد هدف قرار داده و از این طریق باعث مهار فرآیند اتوفآژی و تحریک آپوپتوز در سلول های سرطان گلیوبلاستوما رده U87MG و T98G گردد. هم چنین در این پژوهش مشخص شد که به کارگیری سیلیسین  $50 \mu\text{M}$  باعث افزایش بیان miR-7 و هم چنین miRNA های سرکوب کننده تومور دیگر شامل miR-9 و miR-181a در سلول های U87MG و T98G می شود. البته این اثر سیلیسین طی ترکیب با لوتولین یک فلاونوئید طبیعی تقویت شده بود. از آن

1. Histone deacetylase

طریق تنظیم بیان miRNA ها علاوه بر سرطان در سایر شرایط نیز اثبات شده است. برای مثال Leena و همکاران در پژوهشی نشان دادند که انکوئاسیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) با سیلیسین باعث افزایش بیان pre-miR-20b و pre-miR-410 و کاهش بیان pre-miR-221 و pre-miR-30c-1 می‌گردد که با فعالسازی مسیر BMP/SMAD/RUNX2 همراه است و از این طریق منجر به افزایش تمایز به سلول‌های استخوان ساز (استئوبلاست) می‌شود. در این مطالعه مروری نشان داده شد که چگونه سیلیسین در سلول‌های سرطانی مختلف از طریق تنظیم بیان miRNA ها منجر به مهار تکثیر، متاستاز، اتوفاژی، ماندگاری و مهاجرت سلول‌ها و جلوگیری از تبدیل فنوتایپ اپیتلیالی به مزانشیمی و تحریک آپوپتوز می‌شود. هم چنین با توجه به مطالعات انجام شده، به کارگیری سیستم‌های انتقال دارو مثل کمپلکس سیلیسین با TMC و هم چنین ترکیب سیلیسین با سایر فلاونوئیدها مثل لوتولین می‌تواند اثرات مطلوبتری ایجاد کند. از این رو پیشنهاد می‌شود که اثربخشی سیلیسین بر روی بیان miRNA های دخیل در بیماری‌های گوناگون مثل دیابت، تصلب شرایین، استرس اکسیداتیو، سرطان‌های مختلف و ... مورد بررسی قرار گیرد تا مکانیسم‌های مولکولی دقیق اثرات سیلیسین معین گردد و با هدف گیری بهتری در پروژه‌های درمانی مورد آنالیز قرار بگیرد.

## سپاسگذاری

این مقاله حاصل طرح مصوب در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد ۲۶۳ می‌باشد. از این کمیته که با حمایت‌های خود ما را در انجام این پژوهش یاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم (کد اخلاق ۲۶۳).

## References

- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA

در پژوهشی که توسط Chang و همکاران انجام شد، اثرات ضد سرطانی سیلیسین بر روی سلول‌های کارسینومای اسکواموس سر و گردن از طریق تنظیم بیان miR-494 ثبت شد. در این پژوهش مشخص شد که miR-494 با هدف قرار دادن آنکوژن‌هایی مثل Bmi1 و ADAM10 باعث مهار سلول‌های سرطانی اسکواموس سر و گردن می‌شود و به کارگیری سیلیسین در دوزهای  $50-200 \mu\text{M}$  باعث افزایش بیان miR-494 در این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز می‌گردد (۹۰). Bmi1 یک سرکوب کننده رونویسی می‌باشد که نشان داده شد در شروع تومور، خودنوسازی و متاستاز سرطان سر و گردن نقش دارد (۹۱). ADAM10 نیز یک گلیکوپروتئین سطحی است که در ارتباط با رگزایی و تومورزایی می‌باشد، به نحوی که مهار بیان ADAM10 با کاهش متاستاز و هجوم در سرطان سر و گردن همراه است (۹۲).

تا کنون بیش از دو هزار miRNA مختلف شناسایی شده که انتظار می‌رود بیان حدود ۶۰ درصد ژن‌های ژنوم انسان را تنظیم نمایند. miRNA ها از اهداف مورد توجه در تشخیص، پیشگیری و درمان سرطان هستند. در این راستا مقلدها و مهارکننده‌های miRNA های مختلف طراحی شدند تا بیان پروتئین‌های مختلف مثل فاکتورهای رشد و پروتئین‌های آپوپتوزی را تنظیم کنند. miRNA ها با جنبه‌های مختلف سرطان مثل خودنوسازی، آپوپتوز، متاستاز، مقاومت به داروهای ضدسرطانی و فرار از سیستم ایمنی در ارتباط هستند. سیلیسین ماده موثره اصلی سیلیمارین در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد، در نتیجه پی بردن به مکانیسم دقیق اثرات آن اهمیت زیادی دارد. یکی از مکانیسم‌های مهم اثرات سیلیسین که اخیراً کشف شده است، توانایی آن‌ها در تنظیم بیان miRNA ها می‌باشد و از این طریق قادر است اثرات مثبت چشمگیری در مهار سرطان از خود نشان دهد. اثرات مفید سیلیسین از

- sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140-D144.
2. Ramírez-Moya J, Wert-Lamas L, Santisteban P. MicroRNA-146b promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and thyroid cancer progression by targeting PTEN. *Oncogene* 2018; 37(25): 3369-3383.
  3. Poudyal D, Herman A, Adelsberger JW, Yang J, Hu X, Chen Q, et al. A novel microRNA, hsa-miR-6852 differentially regulated by Interleukin-27 induces necrosis in cervical cancer cells by downregulating the FoxM1 expression. *Sci Rep* 2018; 8(1): 900.
  4. Yu L, Wu D, Gao H, Balic J, Tsykin A, Han TS, et al. Clinical utility of a STAT3-regulated microRNA-200 family signature with prognostic potential in early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 24(6): 1459-1472.
  5. Wu Z, Huang W, Chen B, Bai PD, Wang XG, Xing JC. Up-regulation of miR-124 inhibits invasion and proliferation of prostate cancer cells through mediating JAK-STAT3 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(10): 2338-2345.
  6. Colden M, Dar AA, Saini S, Dahiya PV, Shahryari V, Yamamura S, et al. MicroRNA-466 inhibits tumor growth and bone metastasis in prostate cancer by direct regulation of osteogenic transcription factor RUNX2. *Cell Death Dis* 2017; 8(1): e2572.
  7. Chang TH, Tsai MF, Gow CH, Wu SG, Liu YN, Chang YL, et al. Upregulation of microRNA-137 expression by Slug promotes tumor invasion and metastasis of non-small cell lung cancer cells through suppression of TFAP2C. *Cancer Lett* 2017; 402: 190-202.
  8. Ke J, Shao W, Jiang Y, Xu J, Li F, Qin J. MicroRNA-103 regulates tumorigenesis in colorectal cancer by targeting ZO-1. *Mol Med Rep* 2018; 17(1): 783-788.
  9. Yu S, Zeng YJ, Sun XC. Neuroprotective effects of p53/microRNA-22 regulate inflammation and apoptosis in subarachnoid hemorrhage. *Int J Mol Med* 2018; 41(4): 2406-2412.
  10. Wan RJ, Li YH. MicroRNA-146a/NAPDH oxidase4 decreases reactive oxygen species generation and inflammation in a diabetic nephropathy model. *Mol Med Rep* 2018; 17(3): 4759-4766.
  11. Wang N, Zhu C, Xu Y, Qian W, Zheng M. Negative Regulation of PTEN by MicroRNA-221 and Its Association with Drug Resistance and Cellular Senescence in Lung Cancer Cells. *BioMed Res Int* 2018; 2018.
  12. Zhan T, Huang X, Tian X, Chen X, Ding Y, Luo H, et al. Downregulation of MicroRNA-455<sup>r</sup>-p Links to Proliferation and Drug Resistance of Pancreatic Cancer Cells via Targeting TAZ. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 10: 215-226.
  13. Liu L, Yan J, Xu H, Zhu Y, Liang H, Pan W, et al. Two novel microRNA biomarkers related to  $\beta$ -cell damage and their potential values for early diagnosis of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103(4): 1320-1329.
  14. Li C, Li S, Zhang F, Wu M, Liang H, Song J, et al. Endothelial microparticles-mediated transfer of microRNA-19b promotes atherosclerosis via activating perivascular adipose tissue inflammation in apoE<sup>-/-</sup> mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(2): 1922-1929.
  15. Jones SW, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy CL, Brockbank SJ, et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- $\alpha$  and

- MMP13. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17(4): 464-472.
16. Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 2008; 582(10): 1564-1568.
  17. Romano G, Acunzo M, Garofalo M, Di Leva G, Cascione L, Zanca C, et al. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(41): 16570-16575.
  18. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012; 6(6): 590-610.
  19. Bagheri A, Khorshid HRK, Mowla SJ, Mohebbi HA, Mohammadian A, Yaseri M, et al. Altered miR-223 Expression in Sputum for Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol* 2017; 9(4): 189- 195.
  20. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(24): 15524-15529.
  21. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(39): 13944-13949.
  22. Huang E, Liu R, Chu Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. *Future Oncol* 2015; 11(16): 2351-2363.
  23. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65(21): 9628-9632.
  24. Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, et al. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 2009; 124(10): 2367-2374.
  25. Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(3): 464-473.
  26. Bae S, Lee E-M, Cha HJ, Kim K, Yoon Y, Lee H, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cells* 2011; 32(3): 243-249.
  27. Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, et al. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep* 2014; 31(1): 117-124.
  28. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001;61(14): 2035-2063.
  29. 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.
  30. Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res* 1994; 27(2):105- 112.
  31. Min K, Yoon WK, Kim SK, Kim BH. Immunosuppressive effect of silibinin in

- experimental autoimmune encephalomyelitis. Arch Pharm Res 2007; 30(10): 1265-1272.
32. Cheung CW, Gibbons N, Johnson DW, Nicol DL. Silibinin-a promising new treatment for cancer. Anticancer Agents Med Chem 2010; 10(3):186-195.
33. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435(7043): 834-838.
34. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(5): 376- 885.
35. Yi R, Pasolli HA, Landthaler M, Hafner M, Ojo T, Sheridan R, et al. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. Proc Natl Acad Sci 2008; 106(2): 498-502.
36. Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. Circ Res 2007; 101(1): 59-68.
37. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol 2009;11(3): 228-234.
38. Melo SA, Roper S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. Nat Genet 2009; 41(3): 365- 370.
39. Wu F, Yu L, Cao W, Mao Y, Liu Z, He Y. The N-terminal double-stranded RNA binding domains of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. Plant Cell. 2007;19(3): 914-925.
40. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. Nucleic Acids Res 2007; 35(17): 5944-5953.
41. Sugihara H, Ishimoto T, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, et al. Identification of miR-30e\* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer. PloS One 2013; 8(11): e81839.
42. Griffiths-Jones S. The microRNA registry. Nucleic Acids Research 2004; 32(Suppl\_1): D109-D111.
43. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009;136(2): 215-233.
44. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. Nature 2009; 460(7254): 479- 486.
45. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science 2007; 317(5845): 1764-1767.
46. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature 2007; 447(7146): 823- 828.
47. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies . Nat Cell Biol 2005;7(6): 633- 636.
48. Grewal SI, Elgin SC. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. Nature 2007; 447(7143): 399- 406.
49. Paugh SW, Coss DR, Bao J, Lauder milk LT, Grace CR, Ferreira AM, et al. MicroRNAs form triplexes with double stranded DNA at sequence-specific binding sites; a eukaryotic mechanism via which microRNAs could directly alter gene expression. PLoS Comput Biol 2016;12(2): e1004744.

50. Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, Grummt I. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev* 2010; 24(20): 2264-2269.
51. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009; 460(7256): 705-710.
52. Li E, Zhang J, Yuan T, Ma B. MiR-145 inhibits osteosarcoma cells proliferation and invasion by targeting ROCK1. *Tumor Biol* 2014; 35(8): 7645-7650.
53. Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern Med Rev* 2011; 16(3): 239- 249.
54. Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23(4): 749-754.
55. Hayashi K, Maruhashi T, Sakamoto W, Yogo T. Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles Suppress Oxidative Stress and Repair Damaged Tissues for Treatment of Hepatic Fibrosis. *Adv Funct Mater* 2018; 28(13): 1870086.
56. Leena R, Vairamani M, Selvamurugan N. Alginate/Gelatin scaffolds incorporated with Silibinin-loaded Chitosan nanoparticles for bone formation in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017;158:308-18.
57. Wu JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45(4): 635-641.
58. Prabu SM, Muthumani M. Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress ,inflammation and apoptosis in rats. *Mol Biol Rep* 2012; 39(12):11201-11116.
59. Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice. *Cancer Res* 2007; 67(7): 3483-3491.
60. Cooray HC, Janvilisri T, van Veen HW, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(1): 269-275.
61. Cheng B, Gong H, Li X, Sun Y, Zhang X, Chen H, et al. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419(3): 495-499.
62. de Oliveira DR, Tintino SR, Braga MF, Boligon AA, Athayde ML, Coutinho HD, et al. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. *BioMed Res Int* 2015; 292797.
63. Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67(24): 11612-11620.
64. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18(3): 350-359.
65. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, Riggs KA, Li Y, Klinge CM. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8): 2584-2895.
66. Zadeh MM, Motamed N, Ranji N, Majidi M, Falahi F. Silibinin-induced apoptosis and

- downregulation of microRNA-21 and microRNA-155 in MCF-7 human breast cancer cells. *J Breast Cancer* 2016;19(1):45-52.
67. Jahanafrooz Z, Motamed N, Bakhshandeh B. Effects of miR-21 downregulation and silibinin treatment in breast cancer cell lines. *Cytotechnology* 2017;69(4): 667-680.
68. Wei Z, Cui L, Mei Z, Liu M, Zhang D. miR-181a mediates metabolic shift in colon cancer cells via the PTEN/AKT pathway. *FEBS Lett* 2014; 588(9): 1773-1779.
69. Bhattacharya SD, Garrison J, Guo H, Mi Z, Markovic J, Kim VM, et al. Micro-RNA-181a regulates osteopontin-dependent metastatic function in hepatocellular cancer cell lines. *Surgery* 2010;148(2): 291-297.
70. Shahinfar P, Motamed N, Birjandian E, Shabanpour O. Silibinin: An Inhibitor of Mir-181a Gene Expression in Sk-Br-3 Breast Cancer Cell Line. *Indian J Pharm Educ Res* 2017; 51(4): 597-602.
71. Gao J, Zhang Q, Xu J, Guo L, Li X. Clinical significance of serum miR-21 in breast cancer compared with CA153 and CEA. *Chin J Cancer Res* 2013; 25(6): 743-748.
72. Gasparini P, Lovat F, Fassan M, Casadei L, Cascione L, Jacob NK, et al. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. *Proc Nati Acad Sci* 2014; 111(12): 4536-4541
73. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15(4): 1126-1132.
74. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; 17(1): 28-40.
75. Chang Bp, Wang Ds, Xing Jw, Yang Sh, Chu Q, Yu Sy. miR-200c inhibits metastasis of breast cancer cells by targeting HMGB1. *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci* 2014; 34(2): 201-206.
76. Yazdi Rouholamini SE, Moghassemi S, Maharat Z, Hakamivala A, Kashanian S, Omidfar K. Effect of silibinin-loaded naniosomal coated with trimethyl chitosan on miRNAs expression in 2D and 3D models of T47D breast cancer cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(3): 524-535.
77. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9455-9462.
78. Cufí S, Bonavia R, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraras C, Corominas-Faja B, Cuyàs E, et al. Silibinin suppresses EMT-driven erlotinib resistance by reversing the high miR-21/low miR-200c signature in vivo. *Sci Rep* 2013; 3: 2459.
79. Bornachea O, Santos M, Martínez-Cruz AB, García-Escudero R, Duenas M, Costa C, et al. EMT and induction of miR-21 mediate metastasis development in Trp53-deficient tumours. *Sci Rep* 2012; 2: 434.
80. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283 (22): 14910-14914.
81. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-

- activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009; 11(12): 1487-1495.
82. Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn CO, Heidecke CD, et al. Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* 2011; 31(3): 439-448.
  83. Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression. *Am J Cancer Res* 2016; 6(6): 1287-1301.
  84. Li X, Carthew RW. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 2005; 123(7): 1267-1277.
  85. Chakrabarti M, Ray SK. Anti-tumor activities of luteolin and silibinin in glioblastoma cells: overexpression of miR-7-1-3p augmented luteolin and silibinin to inhibit autophagy and induce apoptosis in glioblastoma in vivo. *Apoptosis* 2016; 21(3): 312-328.
  86. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer. *Cancer Cell* 2003;4(4): 257-262.
  87. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001; 15(7): 807-826.
  88. de Oliveira DT, Sávio ALV, de Castro Marcondes JP, Barros TM, Barbosa LC, Salvadori DMF, et al. Cytotoxic and toxicogenomic effects of silibinin in bladder cancer cells with different TP53 status. *J Biosci* 2017; 42(1): 91-101.
  89. Sun HB, Chen X, Ji H, Wu T, Lu HW, Zhang Y, et al. miR-494 is an independent prognostic factor and promotes cell migration and invasion in colorectal cancer by directly targeting PTEN. *Int J Oncol* 2014; 45(6): 2486-2494.
  90. Chang YC, Jan CI, Peng CY, Lai YC, Hu FW, Yu CC. Activation of microRNA-494-targeting Bmi1 and ADAM10 by silibinin ablates cancer stemness and predicts favourable prognostic value in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 2015; 6(27): 24002-24016.
  91. Allegra E, Trapasso S, Pisani D, Puzzo L. The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology* 2014; 86(4): 199-205.
  92. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 929-941.