

Silymarin Effect on Mitophagy Pathway in the Human Colon Cancer HT-29 Cells

Layasadat Khorsandi^{1,2*} , Maryam Membini² , Ghasem Saki² , Neda Bavarsad³ 

¹ Cellular and Molecular Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Dept of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Nanotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 02 January 2022

Revised: 17 March 2022

Accepted: 10 April 2022

Published Online: 23 November 2022

* Correspondence to:

Layasadat Khorsandi

Cellular and Molecular Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Email:

Khorsandi_cmrc@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: The anti-cancer effects of silymarin have been reported in several studies. However, the mechanism of its action in colon cancer cells is not well understood. This study aimed to investigate the effect of silymarin on the mitophagy pathway and the formation of reactive oxygen species (ROS) in human colon cancer cells (HT-29).

Material & Methods: HT-29 cancer cells and NIH-3T3 non-cancer cells were exposed to 0 (control), 25, 50, and 100 µg/ml of silymarin for 48 h. Cell viability, ROS level, mitochondrial membrane potential (MMP), and expression of important mitophagy-related genes including Pink1 (*PTEN*-induced putative kinase protein 1) and Parkin were examined to evaluate the effects of silymarin.

(Ethic code: IR. AJUMS. CMRC-9503)

Findings: Silymarin significantly reduced the viability percentage of the HT-29 cells depending on the concentration ($P < 0.05$). It also significantly decreased MMP in a concentration-dependent manner while significantly increased ROS formation in the HT-29 cells ($P < 0.05$). In addition, silymarin significantly increased the expression of Pink1 and Parkin genes in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Concentration of 100 µg/ml of silymarin had the greatest effect on reducing viability and MMP, as well as increasing ROS levels and expression of mitophagy-related genes ($P < 0.001$). Silymarin did not cause significant changes in the viability percentage, ROS level, and MMP of the NIH-3T3 non-cancerous cells at different concentrations.

Discussion & Conclusion: According to the results, silymarin increases the level of ROS by decreasing MMP, thereby inducing mitophagy through the Pink1/Parkin signaling pathway in the HT-29 cells.

Keywords: Colon cancer, Mitochondria, Mitophagy, Silymarin

➤ How to cite this paper

Khorsandi L, Membini M, Saki Gh, Bavarsad N. Silymarin Effect on Mitophagy Pathway in the Human Colon Cancer HT-29 Cells. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;30(5): 14-23.



اثر سیلیمارین بر مسیر میتوفاژی در سلول‌های سرطانی کولون انسانی HT-29

لیاسادات خرسندی^{۱،۲*} ID، مریم ممینی^۲ ID، قاسم ساکی^۲ ID، ندا باورصاد^۲ ID^۱ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران^۲ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران^۳ مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه: آثار ضدسرطانی سیلیمارین در مطالعات متعددی گزارش شده است. با وجود این، سازوکار اثر آن در سلول‌های سرطانی کولون به درستی شناخته نشده است. در این مطالعه اثر سیلیمارین بر مسیر میتوفاژی و ایجاد گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول‌های سرطانی کولون انسانی (HT-29) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطانی HT-29 و سلول‌های غیرسرطانی NIH-3T3 به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های ۰ (کنترل)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیمارین قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها، سطح ROS، پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) و بیان ژن‌های مهم مسیر میتوفاژی شامل Pink1 (PTEN-induced putative kinase) و Parkin برای ارزیابی آثار سیلیمارین بررسی گردید.

یافته‌ها: سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت، درصد زنده‌مانی سلول‌های HT-29 را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$)؛ همچنین سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت، سبب کاهش معنی‌داری MMP شد، درحالی‌که تشکیل ROS را در سلول‌های HT-29 به طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). علاوه بر این، سیلیمارین بیان ژن‌های Pink1 و Parkin را به طور معنی‌داری و به صورت وابسته به غلظت افزایش داد ($P < 0.05$). غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیمارین بیشترین تأثیر را در کاهش درصد زنده‌مانی و MMP و همچنین افزایش سطح ROS و بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی داشت ($P < 0.001$). سیلیمارین در غلظت‌های مختلف تغییر معنی‌داری در درصد زنده‌مانی، سطح ROS و MMP در سلول‌های غیرسرطانی NIH-3T3 ایجاد نکرد.

بحث و نتیجه‌گیری: داده‌های این مطالعه نشان می‌دهند که سیلیمارین احتمالاً با کاهش MMP، سبب افزایش سطح ROS و در نتیجه، القای میتوفاژی از طریق مسیر سیگنالینگ Pink1 / Parkin در سلول‌های HT-29 می‌شود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

نویسنده مسئول:

لیاسادات خرسندی

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی،
پژوهشکده علوم پایه پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور
اهواز، اهواز، ایران.

Email:

Khorsandi_cmrc@yahoo.com

واژه‌های کلیدی: میتوفاژی، سرطان کولون، میتوکندری، سیلیمارین

استناد: خرسندی، لیاسادات؛ ممینی، مریم؛ ساکی، قاسم؛ باورصاد، ندا. اثر سیلیمارین بر مسیر میتوفاژی در سلول‌های سرطانی کولون انسانی HT-29.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۱؛ ۳۰(۵): ۱۴-۲۵.



مقدمه

سرطان کولون دومین سرطان رایج جهان است و میزان مرگ و میر ناشی از آن سالانه بیش از ۲ درصد است (۱، ۲). روش‌های درمانی مختلفی برای درمان سرطان‌ها به کار می‌رود که معمولاً با آثار جانبی نامطلوب همراه است و غالباً پاسخ به درمان در این بیماران بسیار ضعیف است؛ بنابراین، تولید داروهایی با عوارض جانبی کمتر و کارایی بیشتر لازم و ضروری است. مشخص شده است که مواد بیواکتیو موجود در گیاهان آثار فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثر ضدسرطانی دارند (۳). سیلیمارین از خانواده فلاونوئیدها است که نقش آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی دارد و عامل محافظت کبدی است. سیلیمارین در میوه خشک گیاه خار شیر (بوته خار مریم) یا کنگر فرنگی وحشی یافت می‌شود (۴). فعالیت ضدسرطانی سیلیمارین و مشتقات آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال، پستان، ریه و پروستات انسان نشان داده شده است (۵-۸). فعالیت ضدسرطانی سیلیمارین در هر دو شرایط برون تنی و درون تنی در سرطان کولون گزارش شده است (۹، ۱۰).

مؤثر بودن یک ترکیب ضدسرطانی به توانایی آن در فعال کردن فرایندهای منتهی به مرگ سلولی بستگی دارد (۲، ۱۱). در مطالعه پیشین نشان دادیم که سیلیمارین مسیرهای مرگ سلولی نکروز و آپوپتوز و همچنین اتوفازای را در سلول‌های سرطانی کولون درگیر می‌کند (۱۲). مطالعه حاضر بر نقش سیلیمارین در مسیر میتوفازای در سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) متمرکز شده است.

میتوفازای یک تخریب انتخابی و هدف‌دار میتوکندری‌ها است که در اصل نوعی اتوفازای به شمار می‌آید و هنگامی اتفاق می‌افتد که در اثر استرس یا تخریبی، میتوکندری دچار نقص شود. میتوفازای به وسیله دو پروتئین Pink1 (PTEN-induced putative kinase protein 1) و Parkin تنظیم

می‌گردد. Parkin یک ژن مرتبط با بیماری ارثی مغلوب پارکینسون است که به عنوان یکی از مهم‌ترین بیومارکرهای میتوفازای شناخته می‌شود. آسیب میتوکندری سبب افزایش تدریجی Parkin می‌گردد و باعث قطعه‌قطعه شدن میتوکندری و تشکیل اتوفازوزوم‌ها و در نهایت، تجزیه میتوکندری توسط لیزوزوم می‌شود. Pink1 یکی دیگر از بیومارکرهای مهم میتوفازای است که با پارکینسون ارثی و ناهنجاری‌های نورولوژیکی ارتباط دارد. مطالعات نشان می‌دهند که Pink1 پروتئین Parkin را برای میتوکندری با عملکرد بد به کار می‌گیرد و پارکین حذف میتوکندری به وسیله میتوفازای را ترغیب می‌کند (۱۳-۱۶).

ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) به وسیله میتوکندری‌های آسیب‌دیده تولید می‌گردد که ممکن است میتوفازای را القا کند که متعاقباً باعث حذف این اندامک می‌شود. مشخص شده است که منشأ ایجاد ROS از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) است که به عنوان عامل محرک میتوفازای عمل می‌کند (۱۷). در این مطالعه اثر سیلیمارین بر میزان تشکیل ROS، MMP و بیان دو ژن مهم مرتبط با میتوفازای در رده سلولی آنوکارسینومای کولون انسانی (HT-29) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و گروه‌های پژوهش: در این مطالعه از رده سلولی HT-29 که یک رده سرطانی کولون انسانی است و سلول‌های غیرسرطانی NIH-3T3 استفاده شده است. این سلول‌ها از انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شدند. این مطالعه با کد اخلاق IR.AJUMS.CMRC-9503 مصوب دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شده است. سلول‌ها در محیط RPMI حاوی سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰

از ۴ ساعت، ۱۰۰ ماکرولیتر دی سولفید سدیم اضافه گردید و در نهایت، جذب محلول مدنظر با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. بررسی میزان بیان ژن با استفاده از تکنیک *Real Time-PCR*: ابتدا RNA توسط Rneasy mini kit از شرکت کیاژن استخراج و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید؛ سپس cDNA با استفاده از کیت Revert PCR Aid First Standard ساخته شد. واکنش PCR با استفاده از master mix و SYBR Green صورت گرفت. توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ آمده است. در این پژوهش، ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد و آنالیز داده‌ها با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ انجام گردید.

اندازه‌گیری میزان تشکیل ROS برای اندازه‌گیری مقدار ROS از معرف ۲-۷ دی کلرو فلورسین دی‌استات استفاده شد. به طور خلاصه، پس از سانتیفوژ سوسپانسیون سلولی، به رسوب حاصل محلول تازه تهیه‌شده دی کلرو فلورسین دی‌استات اضافه گردید و پس از مخلوط کردن ملایم به مدت ۱۵ دقیقه، در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد؛ سپس میزان تشکیل ROS با دستگاه اسپکتروفلوریمتر بر اساس واحد شدت فلورسنس اندازه‌گیری گردید. طول موج‌های Excitation و Emission به ترتیب ۵۰۰ نانومتر و ۵۲۰ نانومتر بودند.

جداسازی میتوکندری: سلول‌ها پس از تیمار، با ۵ میلی‌لیتر محلول ایزولاسیون به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار شدند. محلول ایزولاسیون شامل ۲۵۰ میلی‌مولار سوکروز حاوی ۲۰ میلی‌مولار HEPES-KOH (pH: 7.5)، کلرید پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار)، کلرید منیزیم (۱/۵

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی ژن
GAPDH	رفت 5'-GCAAGAGCACAAGAGGAAGA-3'
	برگشت 5'-ACTGTGAGGAGGGGAGATTC-3'
Parkin	رفت 5'-CTGGAAGTCCAGCAGGTAGAT-3'
	برگشت 5'-TCATCCCAGCAAGATGGACC-3'
Pink1	رفت 5'-CAAGGTCGGGSAGGAAGAG-3'
	برگشت 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

درصد، L-گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند (۱۸). سلول‌های HT-29 با غلظت‌های مختلف سلیماریزین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، برای به دست آوردن مؤثرترین غلظت و زمان تیمار، به صورت پایلوت از طریق تست MTT آزمایش شدند (جدول شماره ۱). پس از مشخص شدن غلظت‌های مؤثر و مدت زمان مطلوب، گروه‌های زیر تشکیل گردیدند:

گروه کنترل: تنها RPMI (محیط کشت) به مدت ۴۸ ساعت دریافت کرد؛ گروه‌های آزمایش: سلیماریزین را با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (SM25، SM50 و SM100) به مدت ۴۸ ساعت دریافت نمودند.

آزمایش MTT: به طور خلاصه، سلول‌ها درون پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و روی سطح هر کدام از خانه‌ها ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده گردید و در گروه‌های مختلف پس از تیمار، ۵۰ ماکرولیتر محلول MTT روی سلول‌ها ریخته شد و پس

جدول شماره ۲. نتایج بررسی درصد زنده‌مانی، سطح ROS و MMP در سلول‌های غیرسرطانی NIH-3T3

گروه‌ها	درصد زنده‌مانی	میزان ROS	MMP
کنترل	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰	۱۰۰±۰/۰۰
SM25	۱۰۰/۱±۰/۰۰	۹۹/۸±۰/۲۱	۹۹/۷±۰/۳۲
SM50	۹۸/۸±۱/۳۷	۹۹/۴±۰/۶۷	۱۰۰/۲±۰/۵۱
SM100	۹۹/۵±۲/۴۶	۱۰۰/۲±۰/۸۵	۹۹/۳±۰/۹۳

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام شده‌اند.

Kruskal-Wallis استفاده گردید. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

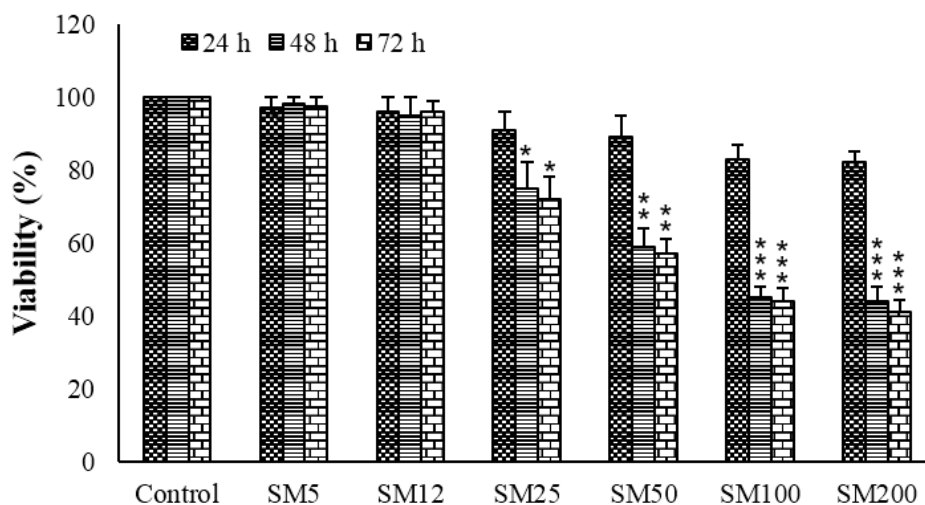
تأثیر سیلیمارین بر درصد زنده مانی سلول‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که سیلیمارین در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به طور معنی داری و به صورت وابسته به غلظت، در مدت ۴۸ ساعت، درصد زنده مانی سلول‌های HT-29 را کاهش می دهد. تفاوت معنی داری میان غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم وجود نداشت (شکل شماره ۱)؛ به همین علت، در این مطالعه برای بررسی آثار سیلیمارین از غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. سیلیمارین در غلظت‌های استفاده شده تغییر معنی داری بر درصد زنده مانی سلول‌های غیرسرطانی NIH-3T3 ایجاد نکرد (جدول شماره ۲).

اندازه گیری سطح ROS سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت و به طور معنی داری باعث افزایش تشکیل ROS در سلول‌های سرطانی HT-29 شده بود. همان طور که در شکل شماره ۲ نمایش داده شده است، با افزایش غلظت

میلی مولار)، EDTA (۱ میلی مولار) و EGTA (۱ میلی مولار) است؛ سپس سلول‌ها هموژنیزه گردیدند و پس از آن، با دور ۷۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی مجدداً در دور ۱۲۰۰۰ برای ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید و در نهایت، رسوب سلولی حاصل در PBS به صورت سوسپانسیون استفاده شد.

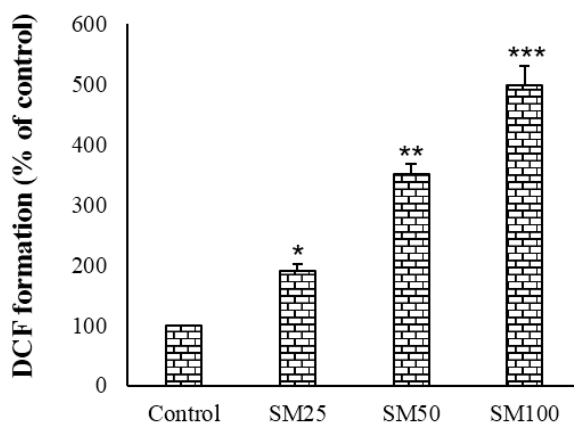
اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری: برای این کار، سوسپانسیون میتوکندری سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت دور ریخته شد؛ سپس محلول رودامین-۱۲۳ به رسوب اضافه گردید. سوسپانسیون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. شدت فلورسانس در طول موج‌های Excitation و Emission به ترتیب ۴۹۰ nm و ۵۳۵ nm توسط اسپکتروفلوریمتر اندازه گیری گردید. تفاوت میان شدت فلورسانس نمونه و کنترل بیانگر میزان آسیب میتوکندری است.

آنالیز آماری: در این مطالعه، برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS vol.21 استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون LSD صورت گرفت. در صورت عدم نرمالیتی، از آزمون



شکل شماره ۱. بررسی درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی HT-29 در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام گرفته‌اند.

***P<0.001 ; **P<0.01 ; *P<0.05



شکل شماره ۲. بررسی میزان تشکیل ROS در سلول‌های سرطانی HT-29 در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام گرفته‌اند.

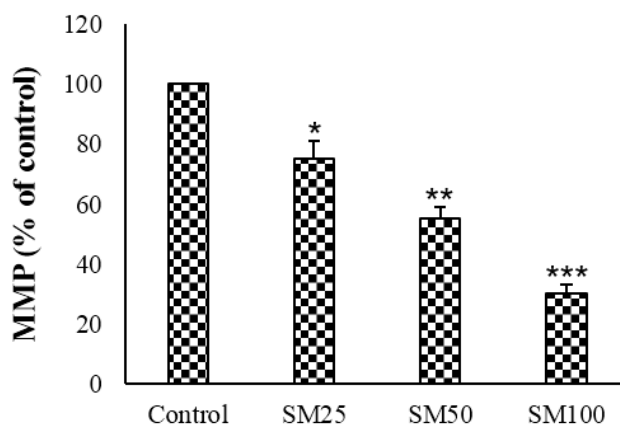
***P<0.001؛ **P<0.01؛ *P<0.05

معنی‌داری در MMP در سلول‌های سالم NIH-3T3 نشان نداد (جدول شماره ۲).

تأثیر سیلیمارین بر بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی: سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت و به طور معنی‌داری بیان ژن Pink1 را در سلول‌های سرطانی HT-29 افزایش داد. با افزایش غلظت سیلیمارین، بیان ژن Pink1 نیز افزایش یافت. این افزایش بیان ژن در گروه‌های SM25، SM50 و SM100 به ترتیب ۴/۳، ۱۰/۲ و ۱۶/۷ برابر بیشتر از گروه کنترل بود (شکل شماره ۴).

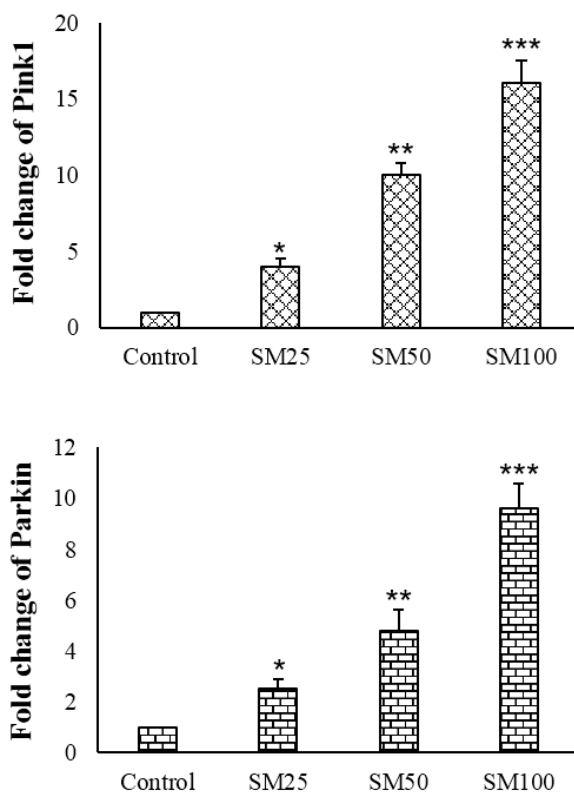
سیلیمارین، میزان ROS نیز افزایش یافته بود. سیلیمارین در غلظت‌های مختلف تغییر معنی‌داری در میزان تشکیل ROS در سلول‌های سالم NIH-3T3 ایجاد نکرد (جدول شماره ۲).

تأثیر سیلیمارین بر MMP: سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت و به طور معنی‌داری سبب کاهش MMP در سلول‌های سرطانی HT-29 نسبت به گروه کنترل شده بود. با افزایش غلظت سیلیمارین، میزان MMP کاهش نشان داد. نتایج اندازه‌گیری MMP در شکل شماره ۳ نمایش داده شده است. سیلیمارین در غلظت‌های مختلف تغییر



شکل شماره ۳. بررسی MMP در سلول‌های سرطانی HT-29 در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام گرفته‌اند.

***P<0.001؛ **P<0.01؛ *P<0.05



شکل شماره ۴. بررسی بیان ژن‌های میتوفاژی در سلول‌های سرطانی HT-29 در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. همه آزمایش‌ها به صورت ۵ بار تکرار انجام گرفته‌اند.

***P<0.001؛ **P<0.01؛ *P<0.05

HCT-116 را مهار می‌کند (۱۹).

کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی کولون می‌تواند ناشی از آثار آپوپتوزی سیلیمارین باشد. لیو و همکارانش (۲۰۱۱) آثار مهارتی سیلیمارین در سلول‌های Anip973 سرطان ریه را مطالعه کردند و دریافتند که سیلیمارین آثار مهارتی بر تکثیر سلول‌های Anpi973 دارد و سبب آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۲۰). کیم و همکاران گزارش کردند که سیلیمارین با القای آپوپتوز، سبب کاهش رشد سلول‌های سرطانی معده انسان (AGS) می‌گردد (۲۱). در مطالعه دیگری مشخص شد که سیلیمارین باعث القای آپوپتوز در سلول‌های ۲۲ RVL و LNcaP سرطان پروستات می‌شود (۹). آثار آپوپتوزی سیلیمارین در سلول‌های سرطانی پروستات (RT-4)، پستان (MCF-7) و هیپاتوما انسانی (HuH7) نیز گزارش شده است (۲۳، ۲۲، ۹).

علاوه بر آپوپتوز، سایر مسیرهای سیگنالینگ مرگ سلولی ممکن است توسط سیلیمارین فعال گردند. در

سیلیمارین همچنین به صورت وابسته به غلظت و به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن Parkin در سلول‌های سرطانی HT-29 شده بود. افزایش بیان ژن Parkin در گروه‌های SM25، SM50 و SM100 به ترتیب ۲/۵، ۴/۸ و ۹/۶ برابر بیشتر از گروه کنترل بود (شکل شماره ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سیلیمارین به صورت وابسته به غلظت، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی کولون را کاهش می‌دهد. این یافته با مطالعات پیشین همسو است که آثار ضدسرطانی سیلیمارین را در سرطان کولون و سایر سرطان‌ها نشان داده‌اند (۱۳، ۱۹). هانگ و همکارانش نشان دادند که سیلیمارین (silibinin؛ از مشتقات سیلیمارین) رشد تعدادی از رده‌های سلولی سرطان کولون مانند Fet، Geo و

فعال‌سازی مجدد قرار می‌گیرد و Parkin را به کار می‌گیرد که به‌نوبه خود، با چندین پروتئین واقع در غشای خارجی میتوکندری تعامل می‌کند و فرایند میتوفاژی را شروع می‌نماید (۱۶-۱۳).

در مطالعه ژانگ و همکارانش مشخص شد که سلیمارین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم باعث افزایش سطح ROS در سلول‌های کارسینومای کبدی انسانی HepG2 می‌شود (۳۴). در مطالعه دیگری نشان داده شد که سیلیبین باعث مرگ سلول‌های سرطانی پستان MDA-MB-231 و MCF7 و سلول‌های سرطانی کولون HT-29 از طریق افزایش سطح ROS در این سلول‌ها می‌گردد (۳۵).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سلیمارین با کاهش MMP، سبب افزایش سطح ROS و در نتیجه، القای میتوفاژی در سلول‌های HT-29 می‌شود. افزایش بیان ژن‌های Pink1 و Parkin درستی این ادعا را اثبات می‌کند. مطالعات بیشتری در آینده باید صورت بگیرد تا تعامل میان مسیرهای مختلف مرگ سلولی ناشی از سلیمارین در سرطان کولون مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مریم ممینی در دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز است. این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز با کد CMRC-9503 انجام شده است. بدین وسیله از همه کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچگونه تعارض منافی با همدیگر ندارند.

کد اخلاق: IR. AJUMS. CMRC-9503

مطالعه پیشین نشان دادیم که سلیمارین از طریق درگیر کردن مسیرهای آپوپتوزی، نکروز و اتوفاژی، مانع رشد سلول‌های HT-29 می‌شود (۱۲). در این مطالعه برای مشخص کردن درگیری سایر مسیرهای مرگ سلولی، بر مسیر میتوفاژی تمرکز شده است. همان‌طور که در نتایج نشان داده شد، سلیمارین به‌صورت وابسته به غلظت، باعث افزایش بیان ژن‌های کلیدی میتوفاژی Parkin و Pink1 می‌گردد. اختلال در بیان پروتئین Pink1 تومورزایی روده بزرگ را در دو مدل موشی سرطان کولون مرتبط با کولیت افزایش داد که نشان می‌دهد Pink1 به‌عنوان سرکوبگر تومور در سرطان کولون عمل می‌کند (۲۴). مشخص شده است که حذف Parkin در رابطه با پیشرفت تومورهای پستان، کولون و کبد است (۲۷-۲۵).

برخلاف نتایج این مطالعه، بعضی از تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که Pink1 ممکن است با تومورزایی و پیشرفت سرطان ریه همراه باشد (۲۸).

موراتا و همکاران گزارش کردند که بیان بیش‌ازحد Pink1 باعث افزایش مقاومت در برابر داروهای شیمی‌درمانی در سلول‌های نوروبلاستوما و سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۲۹). در موش‌هایی که ژن Parkin آن‌ها خاموش شده است، رشد سلول‌های کارسینومای کبدی افزایش می‌یابد (۳۰)؛ اما در سلول‌های گلیوبلاستوما خاموش شدن ژن Parkin سبب توقف رشد این سلول‌ها می‌گردد (۳۱)؛ بنابراین، به‌نظر می‌رسد که تأثیر فرایند میتوفاژی در مهار یا پیشرفت سرطان، به نوع سرطان بستگی داشته باشد (۳۲).

در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن‌های Parkin و Pink1 با افزایش تشکیل ROS و کاهش MMP در سلول‌های سرطان کولون همراه بود. همسو با این یافته، در یک مطالعه مشخص شد که سلیمارین با کاهش MMP در سلول‌های سرطانی کبد، باعث افزایش مرگ این سلول‌ها می‌شود (۳۳).

هنگامی که Pink1 به دنبال کاهش MMP روی غشای خارجی میتوکندری جمع می‌گردد، تحت

References

- Ochoa-Hernandez A, Giron K, Meier J, Charchalac AP. Current options in the management of colorectal cancer in developing countries: Central America Experience. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2020;16:49-54. doi: 10.1007/s11888-020-00452-5
- Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol* 2019; 14:89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072
- Fattahi S, Ardekani AM, Zabihi E, Abedian Z, Mostafazadeh A, Pourbagher R, et al. Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:5317-23. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.9.5317.
- Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res* 2006; 26:4457-98.
- Eo HJ, Park GH, Jeong JB. Inhibition of Wnt signaling by silymarin in human colorectal cancer cells. *Biomol Ther* 2016;24:380-386. doi: 10.4062/biomolther.2015.154.
- Hajighasemlou S, Farajollahi M, Alebouyeh M, Rastegar H, Manazi MT, Mirmoghataei M, et al. Study of the effect of silymarin on viability of breast cancer cell lines. *Adv Breast Cancer Res* 2014; 3:100-105. doi: 10.4236/abcr.2014.33015.
- Wu T, Liu W, Guo W, Zhu X. Silymarin suppressed lung cancer growth in mice via inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 81:460-467. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.039.
- Deep G, Singh RP, Agarwal C, Kroll DJ, Agarwal R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: A comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene* 2006; 25:1053-69. doi: 10.1038/sj.onc.1209146.
- Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett* 2008; 269:352-62. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.053.
- Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer: Chemoprevention by silibinin, Bench to bedside. *Mol Carcinogenesis* 2006; 45: 436-42. doi: 10.1002/mc.20223.
- Basciani S, Vona R., Matarrese P, Ascione B, Mariani S, Cauda R, et al. Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS Lett* 2007; 581:5897-903. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.069.
- Khorsandi L, Saki G, Bavarsad N, Mombeini M. Silymarin induces a multi-targeted cell death process in the human colon cancer cell line HT-29. *Biomed Pharmacother* 2017; 94: 890-97. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.015.
- Narendra D. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183: 795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125.
- Narendra DP. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
- Vives-Bauza C. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 378-83. doi: 10.1073/pnas.0911187107.
- Zhu J, Wang KZ, Chu CT. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* 2013; 9: 1663-76. doi: 10.4161/auto.24135.
- Kubli DA, Gustafsson AB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012; 111: 1208-21. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.265819.
- Banitalebidehkordi M, Ziajahromi N, Sazgar H. Study the effect of Eugenol on CASP8 and CASP9 genes expression in colon cancer cell lines HT-29. *J Ilam Uni Med Sci* 2019; 27: 85-96. doi: 10.29252/sjimu.27.5.85
- Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid silibinin inhibits and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res* 2007; 143: 58-65. doi: 10.1016/j.jss.2007.03.080.
- Li W, Mu DG, Song L, Zhang J, Liang J, Wang C, et al. Molecular mechanism of silymarin-induced apoptosis in a highly metastatic lung cancer cell line anip973. *Cancer Biother Radiopharm* 2011; 26: 317-24. doi: 10.1089/cbr.2010.0892.
- Kim SH, Choo GS, Yoo ES, Woo JS, Han SH, Lee JH, et al. Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2019; 42: 1904-14. doi: 10.3892/or.2019.7295.
- Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder treatment cell papilloma RT4 cells: Evidence for regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2269-80. doi: 10.1093/carcin/bgl098.
- Noh EM, Yi MS, Youn HJ, Lee BK, Lee YR, Han JH et al. Silibinin enhances Ultraviolet-B Induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *J Breast Cancer* 2011; 14: 8-13. doi: 10.4048/jbc.2011.14.1.8.
- Yin K, Lee J, Liu Z, Kim H, Martin DR, Wu D, et al. Mitophagy protein PINK1 suppresses colon tumor growth by metabolic reprogramming via p53 activation and reducing acetyl-CoA production. *Cell Death Differ* 2021; 28: 2421-35. doi: 10.1038/s41418-021-00760-9.
- Okatsu K, Oka T, Iguchi M. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Communication* 2012; 3:1-3. doi: 10.1038/ncomms2016.
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AHV, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics* 2010; 19: 4861-70. doi: 10.1093/hmg/ddq419.
- Pryde KR, Smith HL, Chau KY, Schapira AHV.

- PINK1 disables the anti-fission machinery to segregate damaged mitochondria for mitophagy. *J Cell Biol* 2016; 213: 163-71. doi: 10.1083/jcb.201509003.
28. Lu X, Liu QX, Zhang J, Zhou D, Yang GX, Li MY, et al. PINK1 overexpression promotes cell migration and proliferation via regulation of autophagy and predicts a poor prognosis in lung cancer cases. *Cancer Manag Res* 2020; 12: 7703-14. doi: 10.2147/CMAR.S262466
 29. Murata H, Sakaguchi M, Jin Y. A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2. *J Biol Chem* 2011; 286:7182. doi: 10.1074/jbc.M110.179390.
 30. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008; 27: 6002-11. doi: 10.1038/onc.2008.199
 31. Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001; 20: 4457-65. doi: 10.1038/sj.onc.1204608.
 32. Vernucci E, Tomino C, Molinari F, Limongi D, Aventaggiato M, Sansone L, et al. Mitophagy and oxidative stress in cancer and aging: focus on sirtuins and nanomaterials. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019:6357-87. doi: 10.1155/2019/6387357
 33. Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, S, Augustine TA, Kamaraj S, et al. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Prolif* 2009; 42: 229-240. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00581.x.
 34. Zhang S, Yang Y, Liang Z, Duan W, Yang J, Yan J, et al. Silybin-mediated inhibition of notch signaling exerts antitumor activity in human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2013; 8: e83699. doi: 10.1371/journal.pone.0083699.
 35. Kim TH, Woo JS, Kim YK, Kim KH. Silibinin induces cell death through reactive oxygen species-dependent downregulation of notch-1/ERK/Akt signaling in human breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 349: 268-78. doi: 10.1124/jpet.113.207563.