

Evaluation of Silibinin Effect on Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) Expression and Cell Proliferation in Human Foreskin Fibroblast: An *in Vitro* Study

Soodabeh Elyasi¹, Jina Khayatzaadeh^{*2}, Saeedeh Zafarbalanejad², Sepideh Elyasi³, Mohammad Alizadeh⁴

1. M.Sc, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
3. Associate Professor, Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. B.Sc, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Received: 2019/05/11

Accepted: 2019/07/13

Abstract

Introduction: Fibroblasts are involved in production of growth factors which are effective on cells' growth and differentiation. They are the most adaptable cells in connective tissue with significant capacity for differentiation to the other cell group. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) plays an important role in differentiation and growth of different cell lines. Silibinin is extracted from seeds of *Silybum marianum*, which its effects in cancer cell lines, have been studied in limited studies. In this study we evaluated the silibinin effect on viability and IGF-1 gene expression in human foreskin fibroblast (HFF).

Materials and Methods: The cytotoxic effect of 10, 20, 40 & 60 μ M solution of silibinin was evaluated on HFF cells using MTT assay, after 24 & 48 hours. Then, the expression of IGF-1 gene was evaluated by means of real time-PCR.

Results: Silibinin had toxic effect on HFF cells in dose-dependent manner after 24 hours of incubation in comparison with control group but no significant difference observed after 48 hours. Besides, after 24 hours of incubation, silibinin with a concentration of 20-40-60 μ M significantly increased the IGF-1 gene expression in fibroblast cells in comparison with control group.

Conclusion: Based on the results, silibinin significantly induces IGF-1 gene expression in dose dependent manner after 24 hours incubation with HFF cells. However, in cytotoxicity assay, concentration of 60 μ M caused the highest rate of cell death after 24 hours. So, before introduction of this compound as a fibroblasts proliferation stimulant, more extensive studies are needed.

***Corresponding Author:** Jina Khayatzaadeh

Address: Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Tel: +98513018588

E-mail:

J.khayatzaadeh@mshdiau.ac.ir

Keywords: Silibinin, Human fibroblast, Insulin like growth factor-1

How to cite this article: Elyasi S., Khayatzaadeh J., Zafarbalanejad S., Elyasi S., Alizadeh M. Evaluation of Silibinin Effect on Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) Expression and Cell Proliferation in Human Foreskin Fibroblast: An *in Vitro* Study, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):675-687.

Introduction

Fibroblasts have been identified as connective tissue-based cells with ability to differentiate, grow, and repair. These cells maintain their ability to grow and repair throughout life and can be stimulated by conditions such as wounds or inflamed tissues that secrete large amounts of collagen matrix, which helps to separate and repair tissue. They also have the ability to make multiple adhesions of collagen, elastin, glycosaminoglycans, proteoglycans and glycoproteins. In addition, they are involved in the production of growth factors, which affect cell growth and differentiation. Fibroblasts are inherently different in different parts of the body and could be obtained from various sources such as human foreskin (HFF). In this regard, after circumcision at different intervals, a sample of newborns is prepared after obtaining parental consent. Various studies have examined the release of insulin-like growth factor-I (IGF-1) from human periodontal ligament fibroblasts as a factor that is important in stimulating cell growth and differentiation, but human foreskin fibroblasts have less studies. It has been shown that silibinin is one of the main derivatives of silymarin as the active ingredient of *Silybum marianum*, has anti-cancer, immunomodulatory and anti-inflammatory, antioxidant and lipid peroxidation inhibitory effects. One study examined the efficacy of silymarin on HFF cells as an in vitro model of wound healing. In this study, the effects of different concentrations of silymarin from 4-36 $\mu\text{g/ml}$ on the viability and proliferation of these cells were investigated and no significant change was observed in the proliferation rate. However, the antioxidant capacity of the cells was significantly increased and significant protection against H_2O_2 was obtained. It has been shown the effects of inducing apoptosis in fibroblast-like synovocytes on rats and suggested that it could be used therapeutically in arthritis by this effect. However, the effects of silymarin on IGF-1 gene expression in HFF cells were not investigated. Therefore, according to the results of various studies on releasing IGF-1 from different fibroblasts which is an effective factor in their proliferation, and also the effects of silibinin on the expression of IGF-1 as its anti-cancer mechanism, in this study we aimed to evaluate the effects of silibinin on cell

proliferation and IGF-1 gene expression in HFF cells in vitro.

Methodology

The HFF cell line cultured in DMEM medium with 500 μl of gentamicin and 10% fresh bovine serum and has been grown in an incubator at 37 $^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 . After placing the cells in a 96-well plate with 1×10^5 cells (ml) and changing the culture medium after 24 hours, the cells were treated with different concentrations of silibinin (0, 10, 20, 40, 60 μM) for 48 hours. 10 μl of MTT solution (5 mg/ml in PBS) was added to each well containing fresh culture medium. At the end of incubation, the insoluble formazan produced was dissolved in 100 μl of normal DMSO (for 10 minutes at room temperature in the dark) and finally the optical density (OD) spectrophotometer was read at 570 nm. Based on this, the viability of the cells was calculated. In order to prepare silibinin solution, first stock solution with a concentration of 5 mM of silibinin was prepared. For this purpose, 0.006 g of silibinin powder was dissolved in 25 ml of DMSO. Then, according to the formula $M_1V_1 = M_2V_2$, to prepare a 60 mM solution, 12 μl of the mother solution was diluted with 1 ml of DMEM medium. Similarly, to prepare solutions with concentrations of 10, 20, and 40 μM , 2, 4 and 8 μl of the stock solution was dissolved in 1 ml of DMEM. In the next step, to investigate the effect of silibinin concentrations on IGF-1 gene expression, RNA extraction was performed from all HFF cell groups. For this purpose, first the cells were washed twice with PBS and then exposed to different concentrations of silibinin (10-60 μM) for 24 hours. Then 400 μl of trypsin (w/v) 0.05%, for each 6-well plate was added and the plate was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes. After separation and buoyancy of the cells, they were dispersed again in fresh serum medium to inactivate trypsin (800 μl of culture medium per 6-well plate). 2×10^6 cells were transferred to the microtube and 750 μl of RL solvent was added to it. After the contents of the microtube were uniformized with a pipette, it was incubated at room temperature for 5 minutes. 150 μl of chloroform was added to each microtube, vortexed vigorously for 15 s, and then incubated for 3 min at 15-25 $^\circ\text{C}$. The samples were centrifuged at 13000 rpm for 12 minutes at

4 °C. In the next step, 400 µl of upper colorless water phase was slowly separated and transferred to new microtubes. Then, 400 microliters were added to make RNA precipitate, and the microtubes were gently turned several times to mix thoroughly and become one phase. The samples were centrifuged at 13000 rpm for 1 minute at 4 °C and the supernatant was removed. Then 700 µl of PW was added to each sample and centrifuged at 13000 rpm for one minute and the supernatant was removed again. It was then centrifuged again at 13000 rpm for two minutes to remove the remaining wash buffer. The solution was transferred to a new microtube and then 50 µl of water exposed to DEPC was added

and incubated for three minutes at room temperature. The samples were centrifuged at 13000 g for 1 minute at 4 °C to extract RNA. After that, 2 µl of the sample was taken and quantified by Nano drop spectrophotometer. Finally, they were stored in a -70 °C freezer for RT-PCR testing. Due to the lack of a suitable sequence for IGF-1 gene's primer, primer designing was specifically done for this gene and GAPDH (Table 1) and then Real time-PCR was performed for all the samples. Finally, statistical analysis was performed by using SPSS v22 software. Statistical comparison between groups was also performed by ANOVA test and Tukey-Kramer Post test.

Table 1. Oligonucleotide sequence of primers

Oligonucleotide	5' to 3' sequence	Temperature (°C)
GAPDH Forward	5'-CACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	61.8
GAPDH Revers	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	62.1
IGF-1 Forward	5'-CACCATGTCCTCCTCGCATCTC-3'	61.8
IGF-1 Reverse	5'-CCCTGTCTCCACACACGAACTG-3'	62.1

Result

The results of MTT test indicate that gradually by increasing concentration of silibinin, the survival rate of cells decreased, which was significant in all concentrations compared to the control. But after 48 hours of treatment, there was no significant difference in HFF cells viability with the control group ($P=0.331$). Also, a pairwise

comparison was performed between the viability of HFF cells at different concentrations of silibinin at 24 and 48 hours after treatment, which in the 24-hour treatment, only the difference between 10 and 60 µM was significant. In the case of 48-hour treatment, there was no significant difference between different concentrations (Table 2).

Table 2. Survival rate of HFF after 24 and 48 hours treatment with different concentrations of silibinin in MTT assay

Survival rate of HFF cells after 24 hours of treatment (%) (mean±SD)	Survival rate of HFF cells after 24 hours of treatment (%) (mean±SD)	Silibinin concentrations (µM)
79.0±2.66	72.97 ±83.0	Control
65.8±47.0	41.96 ±76.6	10
63.7±87.59	74.39 ±80.7	20
58.6±84.88	66.17±79.7	40
12.45 ±55.6	55.8 ±79.1	60
<0.001	0.33	P Value

Comparison of differences in HFF cell viability at different concentrations of silibinin after 24 and 48 hours compared with controls was performed by one-way ANOVA test. The difference in 24 hours treatment was insignificant (P value = 0.33) and 48 hours was significant (P value <0.001). It should be noted that according to the results of Tukey-Kramer Posttest, the P value of

HFF cell viability difference between 10 µM and control was insignificant and for other concentrations (20, 40 and 60 µM) compared to control was significant. Also, according to the results of pairwise comparison between cell viability and different concentrations of silibinin after 24 and 48 hours of exposure, by using Tukey-Kramer Posttest, only after 24 hours of exposure, there was mild

significance between 10 and 60 μM concentrations (P value = 0.049).

Evaluation of the silibinin's effects on IGF-1 gene expression in human foreskin fibroblast using Real time RT-PCR and one-way ANOVA test results show that 20, 40 and 60 μM concentrations of silibinin, was able to significantly increase the expression of IGF-1 gene at the mRNA level after 24 hours of exposure to cells. In addition, Tukey-Kramer

Post test showed that this increasing was significant at 20, 40 and 60 μM concentrations compared to the control group. Comparison of IGF-1 gene expression was also performed in pairs after 24-hour treatment with different concentrations of silibinin. Accordingly, between concentrations of 10 μM and 60 μM ; 20, 40 and 60 μM together and 40 μM with 60 μM were significant (Figure 1).

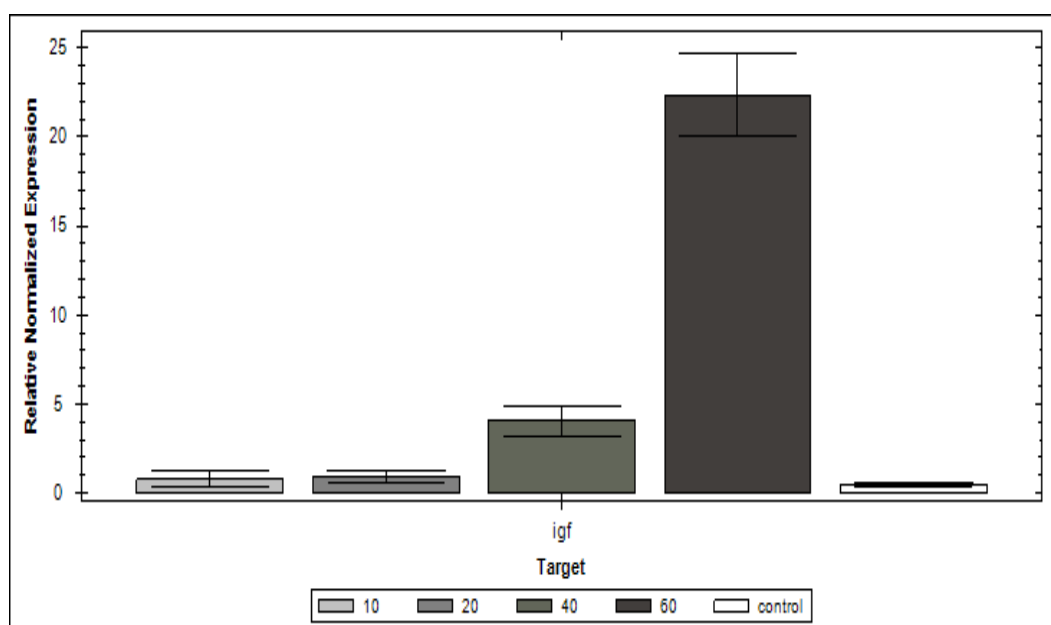


Figure 1. The results of different concentrations of silibinin effects on IGF-1 gene expression: The cells were exposed to silybinin for 24 h at concentrations of 10, 20, 40 and 60 μM . The expression level of the target gene in each sample was normalized against the expression level of the GAPDH gene of that sample. Results were reported using mean \pm standard deviation. ANOVA and Tukey-Kramer Posttest were used to evaluate the level of statistical differences between the groups compared to the control group and a significant level of P value ≤ 0.05 was determined

Conclusions

At the beginning of the present study, in order to determine non-toxic concentrations, the toxicity of silybinin on fibroblasts was evaluated by using MTT method. The results of this study showed that by increasing the concentration of silibinin (10 μM to 60 μM concentration), their toxicity effect on fibroblasts, increased within 24 hours. In other words, cell viability has decreased. In addition, there was a significant difference in cell viability between all four concentrations of silibinin with the negative control group and the effect of silibinin toxicity on HFF cells was concentration dependent. However, after 48 hours of treatment, cell viability was not significantly different from

control probably due to stimulatory effects of silybinin on IGF-1 gene expression and other growth factors. Therefore, confirmation or rejection of this hypothesis requires further study and evaluation of IGF-1 gene expression after 48 hours of exposure to different concentrations of silibinin. In the present study, based on the working method of Zi et al., Only a 24-hour treatment was performed to investigate the effects of silibinin on IGF-1 gene expression, which makes judgment difficult. In a study by Sharifi et al., Which investigated the effect of silimarin on human foreskin fibroblast based on MTT test, after 24 and 48 hours of exposure the cells to 4.36-5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ concentrations of silimarin, no toxic effect was observed. However, in this study, silimarin, which consists

of several different compounds, including silibinin, was used and the concentrations used were low. In the other part of the study, the effect of different concentrations of silibinin on IGF-1 gene expression in HFF cells was investigated by using RT-PCR. Based on the results, silibinin increased the expression of this gene in HFF cells. The concentrations of 20, 40 and 60 μM significantly increased gene expression compared to the control. By increasing the concentration, this effect increased respectively. This is in contrast to the results of studies on prostate and breast cancer cell lines, in which silibinin reduces IGF-1-dependent activity. However, in the study by Zi et al., on androgen-dependent prostate cancer cells, silibinin increased the expression of IGFBP-3, which is the major carrier protein of IGFs in serum and more than 90% of intravascular IGFs are connected to it. Therefore, by increasing the expression of this protein, it reduces IGF-1-dependent signaling and related proliferative processes which does not necessarily indicate a decrease in IGF-1 gene expression. Also in the study of Wong et al., It was mentioned that silibinin reduced the phosphorylation of IGF-1 and not the level of IGF-1 in MCF-7 cells, which seems to have an inhibitory effect on the signaling pathway-dependent IGF-1 and not its gene expression. It has also been suggested that

silibinin may more likely inhibit the antiapoptotic activity of IGF-1 by increasing IGFBP-3 expression and induce apoptosis in cancer cells. However, no study has been performed to investigate the effects of silibinin or silymarin on IGF-1 gene expression in fibroblast cells, and more detailed and extensive studies are needed to confirm or refute the results of this study. In this study, the results showed that silibinin at concentrations of 20-60 μM significantly increased the expression of IGF-1 gene in human fibroblasts. However, according to the results of MTT test, silibinin decreased the number of live fibroblast cells in the culture medium after 24 hours of exposure, depending on the concentration. Therefore, in order to verify the results of this study, further research in this field is suggested.

Acknowledgment

We would like to thank all those who helped us in this research. We would also like to show our gratitude to the anonymous reviewers for their so-called insights.

Conflict Of Interest: The authors of this article declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

تأثیر سیلی‌بینین بر تکثیر سلولی و بیان ژن فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ (IGF-1) در سلول‌های فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی در محیط برون تنی

سودابه الیاسی^۱، جینا خیاطزاده^{۲*}، سعیده ظفربالانژاد^۳، سپیده الیاسی^۳، محمد علیزاده^۴

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)
۳. دانشیار، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. کارشناس، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: فیبروبلاست‌ها در تمام دوران زندگی قدرت ترمیم را حفظ می‌کنند، در تولید عوامل رشد دخالت دارند و در بین سلول‌های بافت همبند، ظرفیت تمایز به دیگر اعضا خانواده را دارا می‌باشند. فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱ (IGF-1) در تمایز و رشد رده‌های سلولی مختلف، نقش مهمی دارد. سیلی‌بینین، فعال‌ترین ترکیب دانه‌های گیاه خار مریم است که تأثیر آن بر سلول سرطانی مطالعه شده است. در این مطالعه تأثیر سیلی‌بینین بر بقای سلولی و بیان ژن IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی (HFF) بررسی شد.

روش کار: میزان سمیت محلول سیلی‌بینین در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار با آزمون MTT بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت و ارزیابی میزان بیان ژن IGF-1، با آزمون Real time-PCR انجام گردید.

یافته‌ها: نیمار سیلی‌بینین پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با کنترل دارای تأثیرات سمی بر فیبروبلاست‌ها بود. اما پس از ۴۸ ساعت، تفاوت نسبت به کنترل معنادار نبود. پس از ۲۴ ساعت تیمار، در غلظت‌های ۲۰ تا ۶۰ میکرومولار سیلی‌بینین، به‌طور معناداری بیان ژن IGF-1 سلول‌های فیبروبلاست نسبت به گروه کنترل افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: سیلی‌بینین احتمالاً به‌صورت وابسته به غلظت باعث القای بیان ژن IGF-1 پس از تیمار ۲۴ ساعته در سلول‌های فیبروبلاست می‌شود. در بررسی سمیت سلولی در غلظت ۶۰ میکرومولار بیشترین مرگ سلولی بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شد؛ از این رو برای معرفی سیلی‌بینین به‌عنوان محرک تکثیر فیبروبلاست‌ها نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تر می‌باشد.

* نویسنده مسئول: جینا

خیاطزاده

نشانی: اردبیل مشهد، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۱۳۶۵-۹۱۷۷۵

تلفن: ۰۱۸۵۸۸-۰۵۱۳

رایانامه:

J.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-3880-0121

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-5258-5299

کلیدواژه‌ها:

سیلی‌بینین، فیبروبلاست انسانی، فاکتور رشد شبه‌انسولین-۱

مقدمه

حفظ می‌کنند و چنانچه تحریک شوند، مثلاً در محل زخم یا در بافت‌های ملتهب، مهاجرت می‌کنند و مقدار زیادی ماتریکس کلاژنی ترشح می‌کنند که به جداسازی و ترمیم بافت کمک می‌کند (۱). فیبروبلاست‌ها کلاژن، الاستین، گلیکوز‌آمینوگلیکان-ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌هایی با خاصیت چسبندگی چندگانه را می‌سازند. همچنین در تولید عوامل رشد که رشد و

فیبروبلاست‌ها سلول‌های بافت همبند می‌باشند که در بالغین به‌ندرت تقسیم می‌شوند اما هنگامی که ارگان، نیازمند فیبروبلاست‌های بیشتر باشد، میتوز در آنها رخ می‌دهد (۱،۲). این سلول‌ها در تمام دوران زندگی، قدرت رشد و ترمیم را در خود

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۰، ص ۶۷۵-۶۸۷

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

۲. مواد و روش‌ها

کشت سلول: رده سلولی فیبروبلاست انسانی ختنه‌گاه از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM همراه با ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و سرم گاو تازه ۱۰ درصد کشت شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ رشد داده شدند.

تیمار سلول‌ها و شمارش تکثیر سلولی: سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه با تعداد 1×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر قرار داده شدند و پس از مدت ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از سیلی‌بینین (10, 20, 40, 60 μ M) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. در پایان زمان انکوباسیون، ده میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) به هر چاهک حاوی محیط کشت تازه اضافه شد. در پایان انکوباسیون، فورمازان نامحلول تولید شده در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO نرمال (به مدت ده دقیقه در دمای اتاق در شرایط تاریکی) حل گردید و در نهایت چگالی نوری (OD) اسپکتروفوتومتر (Biotek Epoch, US) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد: دوام بقا سلولی (A/A control) = (A treated) $\times 100\%$ که در آن A control و A treated به ترتیب جذب سلول‌های تیمار شده و نشده هستند.

تهیه محلول سیلی‌بینین: ابتدا محلول مادر (stock) به غلظت 5 mM از سیلی‌بینین تهیه شد. برای تهیه محلول ذکر شده ۰/۰۰۶ گرم از پودر سیلی‌بینین در ۲۵ میلی‌لیتر از DMSO حل شد. سپس طبق فرمول $M1V1=M2V2$ برای تهیه محلول 60 mM، ۱۲ میکرولیتر از محلول مادر با یک میلی‌لیتر محیط DMEM رقیق شد. به همین ترتیب برای تهیه محلول‌های با غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و میکرومولار، ۲، ۴ و ۸ میکرولیتر از محلول مادر در یک میلی‌لیتر DMEM حل شد.

استخراج RNA و لنج‌ام Real time-PCR: سلول‌های فیبروبلاست انسانی (6×10^5 سلول در هر خانه) در پلیت ۶ خانه کاشته شد و به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ با غلظت ۵ درصد رشد کرد. سپس سلول‌ها دو نوبت با PBS شسته شد و سپس با غلظت‌های مختلف ۶۰-۱۰ میکرومولار از سیلی‌بینین به مدت ۲۴ ساعت مواجه شد. سپس ۴۰۰ μ l تریپسین (۰/۰۵ (w/v) درصد به‌ازای هر چاهک پلیت 6 خانه اضافه گردید و پلیت در ۳۷ °C برای ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از جدا و شناور شدن، دوباره سلول‌ها در محیط حاوی

تمایز سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهند دخالت دارند (۲). فیبروبلاست‌ها در قسمت‌های مختلف بدن ذاتاً متفاوت هستند و حتی در یک ناحیه از بدن نیز ممکن است بین آنها تفاوت وجود داشته باشد. یکی از منابع تهیه سلول‌های فیبروبلاست انسانی، پوست ختنه‌گاه^۱ است. پس از انجام عمل ختنه، در فواصل زمانی مختلف به روش استریل از نوزدان تازه متولد شده، پس از اخذ رضایت از والدین نمونه تهیه می‌شود (۳). فاکتور رشد شبه‌انسولین-1 (IGF-1) که سوماتومدین‌سی نیز نامیده می‌شود، یک هورمون با ساختار مشابه انسولین است که نقش مهمی در رشد کودکان ایفا می‌کند و تأثیرات آنابولیک در بالغین دارد. سلول‌های فیبروبلاست کشت شده، IGF-1 و پروتئین‌های متصل‌شونده به IGF-1 ترشح می‌کنند که ممکن است برای تأثیرات بهینه هورمون رشد، ضروری باشد (۴). مطالعات دیگری نیز آزادسازی IGF-1 از فیبروبلاست‌های لته انسانی مختلف را مورد مطالعه قرار داده که می‌تواند در تحریک رشد و تمایز این سلول‌ها حائز اهمیت باشد (۵، ۶).

گیاه خار مریم^۲ که milk thistle نیز نامیده می‌شود، عضوی از خانواده آستراسه می‌باشد که یک گیاه شناخته شده در طب سنتی به دلیل تأثیرات محافظ کبدی است (۷، ۸). ماده مؤثره این گیاه سیلی‌مارین است که مشتمل بر مخلوط پیچیده‌ای از اجزا به‌ویژه سیلی‌بین (فعال‌ترین ترکیب سیلی‌مارین) می‌باشد (۹، ۱۰). براساس مطالعات مختلف، سیلی‌بینین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، به دام‌اندازنده رادیکال‌های آزاد، مهارکننده پراکسیداسیون لیپیدی فعالیت دارد و نیز تأثیرات ضدسرطانی، ایمنومودولاتوری و ضدالتهابی ویژه‌ای (درمان آرتروز) دارد (۱۱-۱۹). تنها در یک مطالعه اثربخشی سیلی‌مارین بر سلول‌های فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی به‌عنوان یک مدل برون‌تنی ترمیم زخم بررسی شده است (۲۰). از این رو با توجه به آزادسازی IGF-1 از سلول‌های فیبروبلاست مختلف در مطالعات گذشته و تأثیرپذیری تکثیر آن‌ها از طریق بیان IGF-1 و نیز مطرح بودن تأثیرات سیلی‌بینین بر بیان ژن IGF-1 به‌عنوان جز اصلی ترکیب سیلی‌مارین از گیاه خار مریم، در این مطالعه بر آن شدیم به ارزیابی تأثیرات سیلی‌بینین بر تکثیر سلولی و بیان IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی در محیط برون‌تنی بپردازیم و تأثیرات مثبت یا منفی احتمالی سیلی‌بینین را بر بیان ژن IGF-1 بررسی کنیم.

سپس مجدداً به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا بافر شستشوی باقی‌مانده خارج شود. محلول به میکروتیوب جدید منتقل گردید. سپس ۵۰ µl آب مواجه شده با DEPC افزوده شد و سه دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نمونه‌ها ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند تا RNA استخراج شود و در نهایت در فریزر ۷۰°C- برای آزمون RT-PCR نگهداری شدند. پیش از آن، به منظور تعیین مقدار RNA ابتدا میکروتیوب‌ها ورتکس و spin شدند. سپس ۲ µl از نمونه برداشته و RNA توسط دستگاه Nano drop spectrophotometer با استفاده از تنظیمات نوکلئیک اسید تعیین مقدار شد.

از آنجایی که با مراجعه به فرانس‌های معتبر، توالی مناسب برای پرایمر ژن IGF-1 یافت نشد و به‌طور اختصاصی طراحی پرایمر و GAPDH برای این ژن صورت گرفت و سپس توسط شرکت تکاپوزیست پرایمر و GAPDH طراحی شده ساخته و به مشهد ارسال شد (جدول ۱).

سرم تازه به نسبت ۲ برابر حجم تریپسین، پراکنده شدند تا تریپسین غیرفعال شود (۸۰۰ µl) محیط کشت به‌ازای هر چاهک پلیت ۶ خانه). تعداد 2×10^6 سلول به میکروتیوب منتقل گردید و ۷۵۰ µl حلال RL به آن افزوده شد. پس از یکنواخت شدن محتویات میکروتیوب با کمک پیپت به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۱۵۰ µl کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شده ۱۵ ثانیه به‌شدت ورتکس شدند. سپس ۳ دقیقه در ۱۵-۲۵°C انکوبه شدند. نمونه‌ها ۱۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد ۴۰۰ µl از فاز آبی بی‌رنگ بالایی به‌آرامی جدا شد و به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد. سپس به‌منظور ایجاد رسوب RNA، ۴۰۰ µl اتانول ۷۰ درصد به فاز آبی اضافه شد و میکروتیوب‌ها چند بار آرام برگردانده شدند تا کامل مخلوط و تک‌فاز شوند. نمونه‌ها ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و مایع رویی، کامل خارج شد. سپس ۷۰۰ µl از PW به هر نمونه اضافه شد و به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی کامل خارج شد.

جدول ۱. توالی الیگو نوکلئوتیدی پرایمرها

الیگونوکلئوتید	توالی ۵' تا ۳'	دما (درجه سانتی‌گراد)
GAPDH Forward	5'-CACCCACTCTCCACCTTTGAC-3'	۶۱/۸
GAPDH Revers	5'-GTCCACCACCTGTGCTGTAG-3'	۶۲/۱
IGF-1 Forward	5'-CACCATGTCTCCTCGCATCTC-3'	۶۱/۸
IGF-1 Reverse	5'-CCCTGTCTCCACACGAACTG-3'	۶۲/۱

آن اضافه گردید و درب میکروتیوب محکم بسته شد. سپس به سایر میکروتیوب‌ها، ۳/۶ µl از هر رقت RNA اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دستگاه قرار داده شدند و سیکل‌های دمایی براساس جدول ۲ تنظیم شد. نتایج با استفاده از Bio-Rad CFX manager 3.0 آنالیز گردید و نمودارهای استاندارد و ذوب برای 2 ژن GAPDH و IGF-1 به‌دست آمد.

با توجه به نتایج نانودراپ نمونه pool در صورتی که غلظت زیر ۰/۱ µg/µl بود مقدار ۲/۵ µl و اگر بالای آن بود، ۵ µl برداشته شد به‌گونه‌ای که مقدار RNA در نهایت بین ۵-۵۰۰۰ ng باشد. سپس master mix به مقداری اضافه شد که نهایتاً در هر میکروتیوب به اندازه ۲۰ µl محلول وجود داشته باشد. سپس نمونه NTC آماده شد؛ بدین صورت که ۳/۶ µl آب DEPC-Treated به

جدول ۲. سیکل‌های دمایی

Step	زمان	دما	توضیحات
Reverse transcription	۴ دقیقه	۴۲°C	(cDNA synthesis)
PCR Initial activation step:	۴ ثانیه	۹۵°C	Initial PCR activation step
	۳۰ ثانیه	۶۰°C	
۳۵ سیکل			
Denaturation	۳۰ ثانیه	۹۴°C	Denaturation
Annealing and Extension	۳۰ ثانیه	۵۷°C	Annealing and Extension
	۳۰ ثانیه	۷۲°C	
اختیاری:			
Melting curve analysis:	۵ دقیقه	۶۲°C	Melting curve analysis:

آنالیز آماری

با افزایش غلظت سیلی‌بینین در چاهک‌ها پس از ۲۴ ساعت مواجهه، میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش یافته که در مقایسه با کنترل در تمامی غلظت‌ها معنادار بوده است (جدول ۳). اما پس از ۴۸ ساعت تیمار، تفاوت معناداری از لحاظ میزان زنده ماندن سلول‌های HFF با گروه کنترل وجود نداشت ($P=0.331$). همچنین مقایسه دوه‌دو بین میزان زنده ماندن سلول‌های HFF بین غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار نیز انجام شد که در تیمار ۲۴ ساعته تنها تفاوت میان غلظت ۱۰ و ۶۰ میکرومولار معنادار بود. در رابطه با تیمار ۴۸ ساعته هیچ تفاوت معناداری میان غلظت‌های مختلف با هم وجود نداشت (جدول ۳).

کلیه آزمایش‌ها حداقل سه مرتبه و هر بار حداقل دو نمونه انجام شد. نتایج بر مبنای میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS v22 انجام شد. مقایسه آماری بین گروه‌ها توسط آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey-Kramer صورت گرفت. $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار از نظر آماری تلقی شد.

۳. یافته‌ها

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین بر سلول‌های HFF: نتایج آزمون MTT بیانگر این است که به تدریج

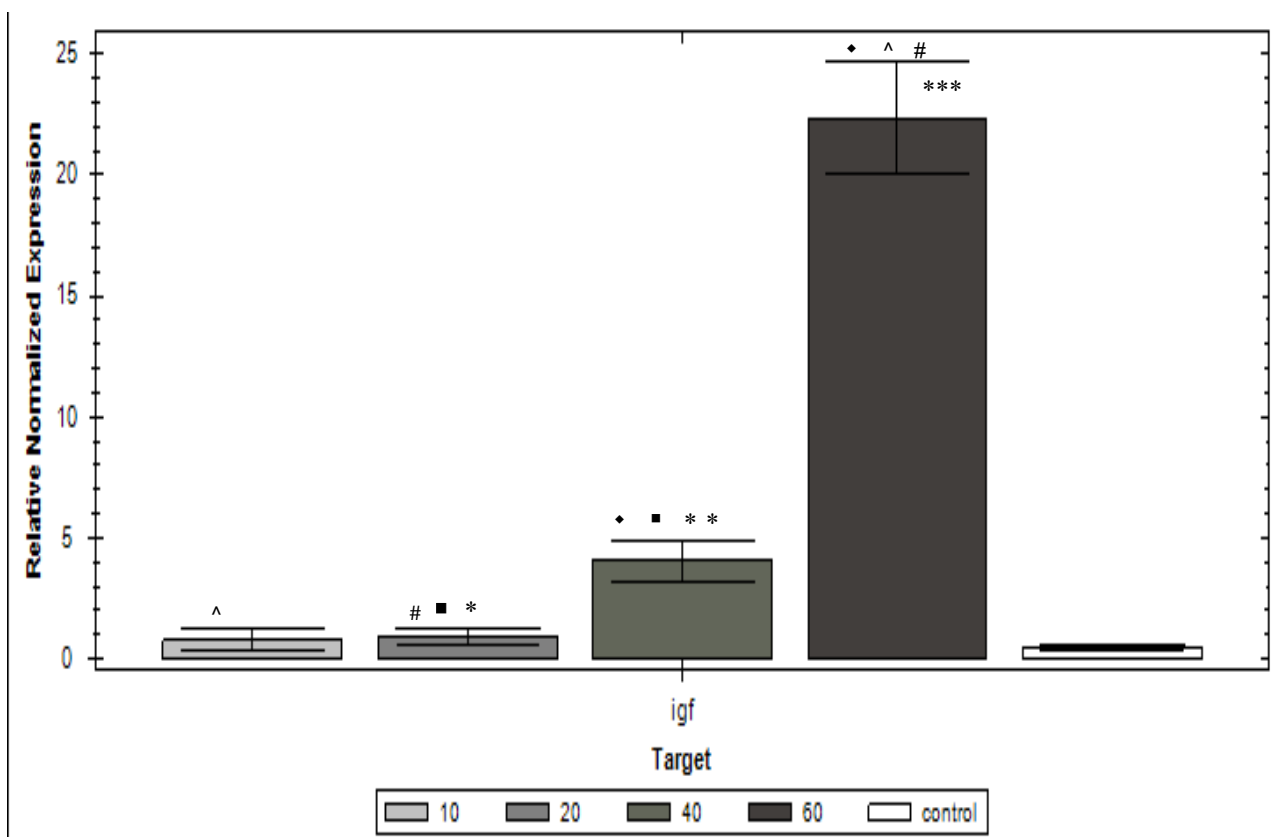
جدول ۳. میزان زنده ماندن سلول‌های HFF پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین در آزمون MTT

غلظت سیلی‌بینین (μM)	میزان زنده ماندن سلول‌های HFF پس از ۴۸ ساعت تیمار (mean \pm SD)	میزان زنده ماندن سلول‌های HFF پس از ۲۴ ساعت تیمار (mean \pm SD) (درصد)
کنترل	۸۳/۰ \pm ۷۲/۹۷	۷۹/۰ \pm ۲۶/۶۶ ^{#@}
۱۰	۷۶/۶ \pm ۴۱/۹۶	۶۵/۸ \pm ۴۷/۰۱ [@]
۲۰	۸۰/۷ \pm ۷۴/۳۹	۶۳/۷ \pm ۸۷/۵۹ [#]
۴۰	۷۹/۷ \pm ۶۶/۱۷	۵۸/۶ \pm ۸۴/۸۸
۶۰	۷۹/۱ \pm ۵۵/۰۸	۵۵/۶ \pm ۱۲/۴۵ [□]
P value	۰/۳۳	<۰/۰۰۱*

* مقایسه تفاوت میزان زنده ماندن سلول‌های HFF در مواجهه با غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با کنترل، با آزمون one-way ANOVA انجام شده است. تفاوت در مواجهه ۲۴ ساعت غیر معنادار ($P \text{ value}=0.33$) و بعد ۴۸ ساعت معنادار بوده است ($P \text{ value}<0.001$). شایان ذکر است که بنابر نتایج آزمون تعقیبی Tukey میزان P value اختلاف زنده ماندن سلول‌های HFF بین غلظت ۱۰ میکرومولار و کنترل ($@$) $P \text{ value} \leq 0.001$ و برای غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار نسبت به کنترل (به ترتیب #، / و +) $P \text{ value} \leq 0.001$ بوده است. همچنین طبق نتایج مقایسه دوه‌دو بین میزان زنده ماندن سلول‌ها بین غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین در مواجهه پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، با کمک آزمون تعقیبی Tukey، تنها پس از ۲۴ ساعت مواجهه بین غلظت ۱۰ و ۶۰ میکرومولار تفاوت خفیف معنادار وجود داشت ($P \text{ value}=0.049$).

افزایش در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نسبت به گروه کنترل معنادار بود ($P = 0.396, 0.026, 0.004, <0.001$). همچنین مقایسه میزان بیان ژن IGF-1 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین به صورت دوه‌دو نیز انجام شد که بین غلظت‌های ۱۰ میکرومولار و ۶۰ میکرومولار ($P = 0.002$)، ۲۰ میکرومولار با ۴۰ میکرومولار ($P = 0.008$) و ۶۰ میکرومولار تفاوت ($P < 0.001$) و ۴۰ با ۶۰ میکرومولار ($P \text{ value}=0.013$) تفاوت معنادار بود (شکل ۲).

بررسی تأثیر سیلی‌بینین بر میزان بیان ژن IGF-1 در سطح mRNA با استفاده از روش Real time RT-PCR: نتایج آزمون آماری one-way ANOVA بر میزان بیان ژن IGF-1 نشان داد که سیلی‌بینین با غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ بیست و چهار ساعت پس از مواجهه با سلول‌های فیبروبلاست توانست در میزان بیان ژن IGF-1 در سطح mRNA افزایش معناداری ایجاد کنند (به ترتیب حدود ۱/۷، ۲، ۹ و ۵۰ برابر کنترل منفی) ($P = 0.005$) سپس با انجام آزمون post hoc tukey مشخص شد که این



شکل ۲. بررسی تأثیر سیلی‌بینین بر میزان بیان ژن IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست foreskin انسانی با استفاده از روش Real time RT-PCR: سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ μM سیلی‌بینین مجاور گشتند. سطح بیان ژن هدف در هر نمونه در مقابل سطح بیان ژن GAPDH آن نمونه نرمالیزه شد. نتایج دو تکرار با استفاده از میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. از آزمون آماری ANOVA و Post test Tukey-Kramer برای بررسی سطح اختلاف آماری گروه‌ها نسبت به گروه کنترل استفاده شد و سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ مشخص شده است. اختلاف بین غلظت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار با کنترل معنادار بود (به ترتیب با علائم *, **, و *** مشخص شده‌اند که * $0.01 < P \leq 0.05$ ، ** $0.001 < P \leq 0.01$ و *** $P \leq 0.001$ بود). میزان بیان ژن IGF-1 در مجاورت با غلظت ۶۰ میکرومولار ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومولار نیز تفاوت معنادار داشت که به ترتیب با علائم ^، # و * مشخص شده‌اند که * $0.01 < P \leq 0.05$ ، ^ $0.01 < P \leq 0.05$ و # $P \leq 0.001$ بود. تفاوت بیان ژن در مواجهه با غلظت ۲۰ و ۴۰ میکرومولار نیز معنادار بود که با * مشخص شده است و $P \leq 0.01$ بود.

علت احتمالی کمتر شدن میزان سمیت سلولی سیلی‌بینین

در آزمون MTT پس از ۴۸ ساعت مواجهه، اثرات تحریکی سیلی‌بینین بر بیان ژن IGF-1 و سایر فاکتورهای رشد می‌تواند باشد که مجموعاً باعث تأثیر غیرمعنادار سیلی‌بینین در مقایسه با کنترل بر تکثیر سلول‌های HFF شده است. البته تأیید یا رد این فرضیه نیازمند انجام مطالعه تکمیلی و بررسی میزان بیان ژن IGF-1 پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت‌های مختلف سیلی‌بینین می‌باشد که در مطالعه حاضر براساس روش کار مطالعه Zi و همکاران تنها تیمار ۲۴ ساعته برای بررسی تأثیرات سیلی‌بینین بر بیان ژن IGF-1 صورت گرفته است که قضاوت را مشکل می‌سازد. در مطالعه شریفی و همکاران که به بررسی تأثیر سیلی‌مارین بر فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی پرداخته‌اند، در آزمون MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجهه سلول‌ها با غلظت‌های ۵-۴/۳۶ μg/ml از سیلی‌مارین هیچ تأثیر توکسیکی مشاهده شده نشد. البته در این مطالعه سیلی‌مارین که خود متشکل از چند ترکیب مختلف از جمله سیلی‌بینین است مورد استفاده قرار

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، در ابتدای مطالعه به منظور تعیین غلظت‌های غیرسمی، میزان سمیت سیلی‌بینین بر سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از روش MTT بررسی شد. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت سیلی‌بینین پس از ۲۴ ساعت، میزان زنده ماندن سلول‌ها از غلظت ۱۰ میکرومولار به سمت غلظت ۶۰ میکرومولار کاهش معنادار یافته است. به عبارتی تأثیر سمیت بر سلول‌ها بیشتر شده است. اما پس از ۴۸ ساعت تیمار، میزان زنده ماندن سلول‌ها با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. طبق نتایج پس از ۲۴ ساعت تیمار، اختلاف معنی‌داری از نظر میزان زنده ماندن سلول‌ها بین هر چهار غلظت سیلی‌بینین با گروه کنترل منفی وجود دارد و تأثیر سمیت سیلی‌بینین روی سلول‌های HFF وابسته به غلظت است. براساس نتایج حاضر، سیلی‌بینین به صورت وابسته به غلظت باعث افزایش بیان ژن IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست گردید.

مختلف اعمال شود. اما تا به حال مطالعه‌ای به بررسی تأثیرات سیلی‌بینین یا سیلی‌مارین بر بیان ژن IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست مشاهده نشده است و برای تأیید یا رد نتایج مطالعه حاصل نیازمند مطالعات دقیق‌تر و گسترده‌تر تکمیلی هستیم. تنها مطالعه موجود بر سلول‌های فیبروبلاست ختنه‌گاه انسانی، به بررسی تأثیر سیلی‌مارین با غلظت‌های مختلف بر پرولیفراسیون سلول‌های فوق پرداخته است که اثر معناداری را گزارش نکرده اما ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی سلول‌ها افزایش یافته بود (۱۹). ممکن است علت این موضوع، غلظت پایین محلول کاربردی باشد که به نسبت مطالعه حاضر، غلظت کمتر از سیلی‌بینین با سلول‌ها مواجهه یافته‌اند. در آزمون MTT نیز در این مطالعه، اثری از سیلی‌مارین بر زنده ماندن سلول‌ها مشاهده نشد که می‌تواند مؤید فرضیه فوق باشد. تأثیرات احتمالی سیلی‌مارین بر بیان IGF-1 نیز بررسی نشده است.

در این مطالعه نتایج نشان داده شد که سیلی‌بینین در غلظت‌های ۲۰-۶۰ میکرومولار به‌طور معناداری باعث افزایش بیان ژن IGF-1 در سلول‌های فیبروبلاست انسانی شد؛ هرچند براساس نتایج آزمون MTT سیلی‌بینین پس از ۲۴ ساعت مواجهه، به‌طور وابسته به غلظت موجب کاهش تعداد سلول‌های فیبروبلاست زنده در محیط کشت گردید. بنابراین به‌منظور راستی‌آزمایی نتایج این مطالعه، انجام پژوهش‌های بعدی در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه افرادی که با همکاری خود، اجرای این پژوهش را امکان‌پذیر نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

- [1]. Mohammed H, Desjardins-Park HE, Foster DS, Longaker MT. Fibroblasts and wound healing: an update. *Regen. Med.* 2018; 13(5), 491-495.
- [2]. Zomer HD, Vidane AS, Goncalves NN, Ambrosio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem cells and cloning: advances and applications.* 2015;8:125.
- [3]. Oliveira T, Costa I, Marinho V, Carvalho V, Uchôa K, Ayres C, Teixeira S, Vasconcelos DF. Human foreskin fibroblasts: From waste bag to important biomedical applications. *Journal of Clinical Urology.* 2018;11(6):385-94.
- [4]. R. G., Ahmed & Uçar, Ahmet. Growth Disorders and Acromegaly. 10.5772/intechopen.78180. 2020, Pages 117-118.
- [5]. Yang J, Zhou J, Cui B, Yu T. Evaluation of hypoxia on the expression of miR-646/IGF-1 signaling in human periodontal ligament cells (hPDLs). *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 2018;24:5282.
- [6]. Pumklin J, Manokawinchoke J, Bhalang K, Pavasant P. Intermittent compressive stress enhanced insulin-like growth factor-1 expression in human periodontal ligament cells. *International journal of cell biology.* 2015; 28;2015.
- [7]. Kasi Pandima Devi. Milk Thistle (*Silybum marianum*). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Academic Press, 2019, Pages 321-325.
- [8]. Csonka C, Sarkozy M, Pipicz M, Dux L, Csont T. Modulation of Hypercholesterolemia-Induced Oxidative/Nitritive Stress in the Heart. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; oi: 10.1155/2016/3863726. Epub 2015: 14.
- [9]. Bijak M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules.* 2017 ;22(11):1942.
- [10]. Aziz M, Saeed F, Ahmad N, Ahmad A, Afzaal M, Hussain S, Mohamed AA, Alamri MS, Anjum FM. Biochemical profile of milk thistle (*Silybum Marianum* L.) with special reference to silymarin content. *Food Science & Nutrition.* 2021;9(1):244-50.

- [11]. Santos UP, Campos JF, Torquato HF, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, de Picoli Souza K, Dos Santos EL. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167531.
- [12]. Karimi G, Hassanzadeh-Josan S, Memar B, Esmaeili SA, Riahi-Zanjani B. Immunomodulatory effects of silymarin after subacute exposure to mice: A tiered approach immunotoxicity screening. *Journal of pharmacopuncture*. 2018;21(2):90.
- [13]. Rugamba A, Kang DY, Sp N, Jo ES, Lee JM, Bae SW, Jang KJ. Silibinin Regulates Tumor Progression and Tumorsphere Formation by Suppressing PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells. *Cells*. 2021;10(7):1632.
- [14]. Singh P, Singh M, Kanoujia J, Arya M, Saraf SK, Saraf SA. Process optimization and photostability of silymarin nanostructured lipid carriers: effect on UV-irradiated rat skin and SK-MEL 2 cell line. *Drug Deliv Transl Res* 2016; 6(5): 597-609.
- [15]. Hussain Y, Mirzaei S, Ashrafzadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, Khan H, Daglia M. Quercetin and Its Nano-Scale Delivery Systems in Prostate Cancer Therapy: Paving the Way for Cancer Elimination and Reversing Chemoresistance. *Cancers*. 2021;13(7):1602.
- [16]. Binienda A, Ziolkowska S, Pluciennik E. The anticancer properties of silibinin: its molecular mechanism and therapeutic effect in breast cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2020;20(15):1787-96.
- [17]. Raina K, Kumar S, Deepanshi D, Agarwal R. Silibinin and colorectal cancer chemoprevention: a comprehensive review on mechanisms and efficacy. *J Biomed Res*. 2016; 30(6): 452-465.
- [18]. Anestopoulos I, Sfakianos AP, Franco R, Chlichlia K, Panayiotidis MI, Kroll DJ, Pappa A. A Novel Role of Silibinin as a Putative Epigenetic Modulator in Human Prostate Carcinoma. *Molecules*. 2016; 22(1). pii: E62.
- [19]. Tong WW, Zhang C, Hong T, Liu DH, Wang C, Li J, He XK, Xu WD. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. *Sci Rep* 2018; 8: 3241.
- [20]. Juránová J, Aury-Landas J, Boumediene K, Baugé C, Biedermann D, Ulrichová J, Franková J. Modulation of skin inflammatory response by active components of silymarin. *Molecules*. 2019;24(1):123.
- [21]. Suina K, Tsuchihashi K, Yamasaki J, Kamenori S, Shintani S, Hirata Y, Okazaki S, Sampetean O, Baba E, Akashi K, Mitsuiishi Y. Epidermal growth factor receptor promotes glioma progression by regulating xCT and GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate-sensitive glutamate receptor signaling. *Cancer science*. 2018;109(12):3874-82.