

## Review Paper

### Silibinin Cytotoxic Effect on MCF-7 Cell Line

Sayedeh Elmira Yazdi-Rouholamini<sup>1</sup>, \*Nasrin Motamed<sup>2</sup>, Mohammad Tahmaseb<sup>3</sup>, Kobra Omidfar<sup>4</sup>

1. MA Student, Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
4. Associate Professor, Biosensor Research Center, Cellular & Molecular Institute, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Citation:** Yazdi-Rouholamini SE, Motamed N, Tahmaseb M, Omidfar K. [Silibinin Cytotoxic Effect on MCF-7 Cell Line (Persian)]. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016; 23(3):386-391. <http://dx.doi.org/10.21859/sums-2303386>

**doi:** <http://dx.doi.org/10.21859/sums-2303386>

Received: 03 Apr. 2016

Accepted: 17 Jun. 2016

#### ABSTRACT

**Background** Metastatic cancers, such as breast cancer, are generally resistant to chemotherapy. Therefore, many studies try to find new and effective compounds to treat this type of cancer. In this study, we examined the silibinin toxic effect on tumor growth and proliferation of MCF-7 cell line.

**Materials & Methods:** MTT assay was used to assess the inhibitory effect of silibinin on metabolic activity of MCF-7 cells. For this purpose, seeded cells were plated onto 96-well plates and then exposed to varying concentrations of silibinin (0-350 ug/mL) for different times (24, 48, and 72 h). The percentage of metabolic activity was calculated according to the MTT test. In the next step, in order to evaluate the effect of silibinin on apoptosis in MCF-7 cells, Caspase 3/7 assay was used.

**Results :** Our results indicated that silibinin inhibited metabolic activity of MCF-7 cells in a dose-dependent manner and it could induce apoptosis pathway in these cells.

**Conclusion** The study showed that treatment of MCF-7 cell line with silibinin can be through induction of apoptosis, inhibition of the growth and proliferation of the cells. Due to the significant inhibitory effect of silibinin on MCF-7 cells, it seems important for researchers to utilize milk thistle in the treatment and prevention of cancer.

**Key words:**

Silibinin, MCF-7 cell line, Apoptosis

**\* Corresponding Author:**

Nasrin Motamed, PhD

Address: Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 3905218

E-mail: motamed2@khayam.ut.ac.ir

## بررسی اثر سایتوتوکسیک سیلیبینین بر رده سلولی MCF-7

سیده‌المیرا یزدی روح‌الامینی<sup>۱</sup>، نسرين معتمد<sup>۲</sup>، محمد طهماسب<sup>۳</sup>، کبری امیدفر<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده سلولی و مولکولی، پژوهشکده تحقیقاتی متابولیسم و غده، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۵ فروردین ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۲۸ خرداد ۱۳۹۵

**اهداف:** سرطان‌های متاستاتیک مثل سرطان پستان، معمولاً به شیمی‌درمانی مقاوم هستند؛ لذا یافتن ترکیبات مؤثر و جدید برای درمان این نوع سرطان‌ها مدنظر محققان قرار دارد. در این پژوهش اثر سمی سیلیبینین بر رشد و تکثیر رده سرطانی MCF-7 بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** برای بررسی اثر مهار سیلیبینین بر فعالیت متابولیسی سلول‌های MCF-7 آزمایش MTT انجام شد. بدین منظور سلول‌ها را در پلیت ۹۶ خانه کشت کردیم، سپس در زمان‌های متفاوت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، در معرض غلظت‌های مختلف سیلیبینین ۰ تا ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار دادیم و به این ترتیب درصد فعالیت متابولیسی سلول‌ها را محاسبه کردیم. همچنین به منظور بررسی تأثیر سیلیبینین بر آپوپتوز آزمایش کاسپاز ۳ و ۷ را انجام دادیم.

**یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد سیلیبینین موجب مهار فعالیت متابولیسی رده سلولی MCF-7 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود، همچنین آپوپتوز را در این سلول‌ها القا می‌کند.

**نتیجه‌گیری:** این تحقیق نشان داد که تیمار رده سلولی MCF-7 با سیلیبینین می‌تواند از طریق القای آپوپتوز، موجب مهار رشد و تکثیر آن شود. باتوجه به تأثیر مهار معناداری که تیمار سلول‌ها با سیلیبینین به دنبال دارد، به نظر می‌رسد زمینه تحقیقاتی مناسبی برای بهره‌برداری از گیاه خارمریم در کنترل و درمان سرطان‌ها وجود دارد.

### کلیدواژه‌ها:

رده سلولی MCF-7، سیلیبینین، آپوپتوز

### مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان و به‌عنوان دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان شناخته می‌شود [۱، ۲]. شیوع این سرطان به حدی است که گفته می‌شود در برخی کشورهای غربی از هر هفت زن، یک نفر در طول عمر خود به سرطان پستان دچار می‌شود. این مهم به‌ویژه در بانوان میان‌سال نگران‌کننده‌تر است [۳، ۴].

از عوامل اساسی بروز سرطان می‌توان به عوامل محیطی از جمله آلودگی هوا، استرس، الگوی زندگی نامناسب و رژیم غذایی نامتعادل اشاره کرد که با ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی در بدن، موجب بروز بدخیمی می‌شوند [۵-۷]. از طرف دیگر باوجود استفاده از راهکارهای درمانی مانند جراحی و شیمی‌درمانی و رادیوتراپی همچنان میزان مرگ‌ومیر در بیماران بالاست که

نشانه‌گر ناکارآمدی این راهکارهای درمانی است. همچنین تأثیر مخرب شیمی‌درمانی و پرتودرمانی بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم نیز از جمله معایب دیگر این نوع درمان‌ها محسوب می‌شود. مصرف مواد غذایی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند، در پیشگیری و کاهش ابتلا به سرطان‌ها نقش مؤثری دارد. باتوجه به نکات ذکر شده، در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از فرآورده‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی روبه‌فزونی است. در این میان آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنول طبیعی به‌علت کارایی مناسب و تأثیر جانبی کم، به‌عنوان یکی از مؤثرترین ترکیبات ضدسرطان شناسایی شده‌اند [۸، ۹].

سیلیمارین یک فلاونوئید پلی‌فنولیک است که از دانه‌های گیاه خارمریم استخراج می‌شود و حدود ۹۰ درصد از آن را ترکیبی به نام سیلیبینین تشکیل می‌دهد. سیلیبینین ناهم‌هنگی بین بقای سلول و آپوپتوز را از طریق دخالت در بیان ژن‌های دخیل در چرخه

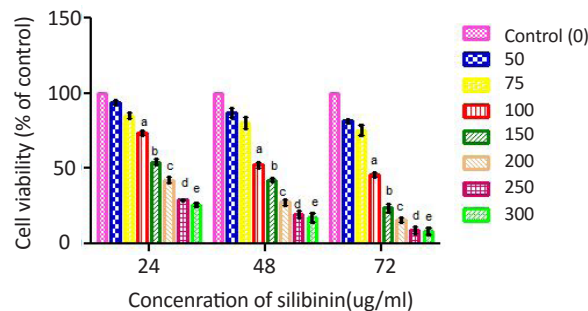
\* نویسنده مسئول:

دکتر نسرين معتمد

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم سلولی و مولکولی.

تلفن: ۳۹۰۵۲۱۸ (۹۱۲) +۹۸

پست الکترونیکی: motamed2@khayam.ut.ac.ir



تصویر ۱. مقایسه غلظت‌های متفاوت سیلی‌بینین در تکثیر و بقای سلول‌های MCF-7 در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت. سلول‌های MCF-7 به تعداد هفت‌هزار سلول در هر چاهک کشت داده شدند. هر داده نشانگر میانگین و انحراف‌معیار حاصل سه تکرار است.

دی‌متیل‌سولفو کساید حل و جذب آن با دستگاه الیسا ریدر مدل پاور ویو ایکس اس ۲ ساخت شرکت بیوتک، در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (این آزمایش ۳ مرتبه تکرار شد). برای محاسبه اثر توکسیسیتی داروی سیلی‌بینین روی بقای سلول‌های MCF-7 و بررسی میزان مرگ سلول‌های تیمار شده از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد توانایی حیاتی سلول‌ها} = \frac{OD_{exp}}{OD_{cont}} \times 100$$

در این فرمول  $OD_{exp}$  و  $OD_{cont}$  به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) است. پس از اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌ها  $IC_{50}$  سلول‌ها در هر بازه زمانی محاسبه شد.

### سنجش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷

در این مرحله از کیت کاسپاز ۳ و ۷ شرکت پرومگا<sup>۳</sup> استفاده شد. این کیت میزان لومینسانس ایجاد شده در اثر فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ را اندازه‌گیری می‌کند. کاسپازها از پروتئازهای سیستمین آسپارتیک‌اسید هستند و نقشی اساسی در آپوپتوز سلول‌های پستانداران دارند. کیت کاسپاز ۳ و ۷ حاوی پروتئین آمینولوسیفرین متصل شده به تتراپپتید DEVD (مانند آسپارتیک‌اسید، گلوتامین، والین، آسپارتیک‌اسید) است که به‌عنوان پیش‌ماده اختصاصی برای کاسپازهای ۳ و ۷ عمل می‌کند. همچنین این کیت، بافری مناسب برای فعالیت کاسپاز و لوسیفرافز دارد. افزودن این بافر به سلول‌ها منجر به تجزیه آن‌ها و جداسدن تتراپپتید از آمینولوسیفرین، در اثر فعالیت کاسپازها می‌شود. به‌دنبال آن آمینولوسیفرین به‌عنوان پیش‌ماده لوسیفرافز عمل می‌کند و این آنزیم باعث تجزیه آن می‌شود و لومینسانس تولید می‌کند. پرتو نوری تولید شده با میزان فعالیت کاسپازهای تولید شده در سلول‌های در حال آپوپتوز متناسب است و با دستگاه

سلولی و آپوپتوز، تنظیم می‌کند. بررسی‌های مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی روی سیلی‌بینین مؤید نقش آن به‌عنوان ترکیبی ضد سرطانی است [۱۰-۱۲]. نقش ضد سرطانی این ترکیب روی ریه [۱۳]، تخمدان [۱۴]، گلیوبلاستوما [۱۵]، پروستات [۱۶]، مثانه [۱۷]، کبد [۱۸]، پستان [۱۹] و کلون [۲۰] گزارش شده است.

### مواد و روش‌ها

#### کشت سلول

رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (گیبکو)<sup>۱</sup> همراه با ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنسیلین استرپتومایسین (سیگما)<sup>۲</sup> و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (گیبکو) کشت شدند و در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد از  $CO_2$  رشد داده شدند.

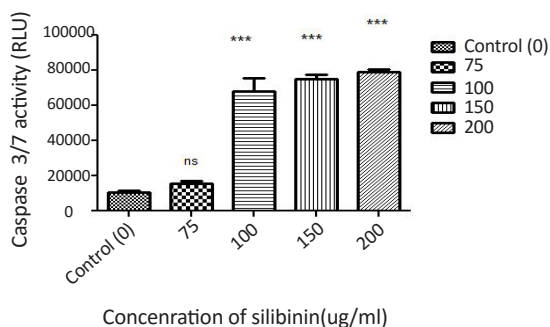
#### تیمار سلول‌ها و سنجش تکثیر سلولی

ابتدا سلول‌های MCF-7، با غلظت‌های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی سیلی‌بینین تیمار شدند، سپس به ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شدند.

برای اندازه‌گیری توان حیاتی سلول و تأثیر سمی سیلی‌بینین بر رشد و تکثیر رده سلولی MCF-7، از آزمایش MTT استفاده شد. آزمایش بدین صورت بود که ابتدا هفت‌هزار سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه کاشته شد. برای چسبیدن به کف پلیت و رسیدن به تراکم ۷۰ درصد، ۲۴ ساعت به آن‌ها زمان داده شد. سپس با غلظت‌های مذکور از سیلی‌بینین تیمار و پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محلول متیل‌تيازولتزازولیوم (MTT) تعویض و به مدت ۴ ساعت آنکوبه شد. سپس بلورهای فورمازان حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر

1. Gibco  
2. Sigma

3. Promega



تصویر ۲. بررسی فعالیت کاسپاز ۳ و ۷. با افزایش غلظت سیلی بینین، افزایش معناداری در فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ در سلول های MCF-7 مشاهده شد.

۳۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر گروه کنترل سبب مهار رشد سلول ها شدند. در غلظت های پایین سیلی بینین (۵۰ و ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) کاهش معناداری در توان زیستی سلول ها مشاهده نشد. مقایسه داده ها در دزهای استفاده شده برای سیلی بینین در زمان های مختلف نشان داد که روند کاهش درصد توان زیستی سلول ها با افزایش غلظت و با گذشت زمان همراه است (تصویر شماره ۱). همچنین برای هر یک از زمان های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت دزی از سیلی بینین محاسبه و تعیین شد که به واسطه آن ۵۰ درصد سلول ها زنده می ماندند (جدول شماره ۱).

شکست پروتئولیتیک پروتئین های سلولی با ارزیابی فعالیت کاسپاز مشخص شد؛ به طوری که در بالاترین غلظت سیلی بینین استفاده شده در این مطالعه (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) طی ۴۸ ساعت پس از تیمار، بیشترین فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ مشخص شد. پس با افزایش غلظت سیلی بینین، افزایش معناداری در فعالیت کاسپاز ایجاد شد که بیانگر افزایش فعالیت مولکول های پرو آپوپتوزی در برابر محرک های القایی آپوپتوز (سیلی بینین) است (تصویر شماره ۲).

## بحث

در این پروژه نشان داده شد که تیمار رده سرطانی MCF-7 با سیلی بینین می تواند سبب مهار رشد سلول های MCF-7 شود.

یوسفی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعاتشان نشان دادند که سیلی بینین موجب مهار تکثیر سلول های سرطانی SKBR3 می شود و با افزایش غلظت به کاررفته، اثر مهار آن نیز افزایش

لومینومتر در دامنه ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر آشکار می شود.

برای این منظور سلول ها در فلاسک T-25 کاشته شدند و پس از ۲۴ ساعت که تراکم آن ها به ۷۰ درصد رسید. براساس نتایج به دست آمده از آزمایش MTT، سلول ها با دزهای ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از سیلی بینین تیمار شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی این زمان با اضافه کردن بافر لیز سلولی به هر فلاسک، سلول ها به مدت ده دقیقه به صورت سوسپانسیون در یخ انکوبه و سانتریفوژ (۱ دقیقه و ۱۰۰۰×g) شدند. سپس پنج میکرولیتر از معرف با سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ، ادغام و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت دو ساعت انکوبه شد. شکست کروموفور توسط کاسپاز ۳ و ۷، بیانگر فعالیت آنزیم است که با استفاده از دستگاه لومینومتر میزان نشر نور اندازه گیری شد. برای دقت بیشتر نتایج هر تیمار سلولی سه بار کشت داده و میزان جذب آن خوانده شد.

از نرم افزار گراف پاد (پریزم ۶) برای تحلیل داده های حاصل از MTT و آزمایش کاسپاز ۳ و ۷ در دزها و زمان های مختلف استفاده و معناداری نتایج بررسی شد. مقادیر به دست آمده با  $P < 0.05$  از نظر آماری معنادار بود.

## یافته ها

نتایج تأثیر سیلی بینین بر توان حیاتی سلول ها حاکی از آن بود که غلظت های ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و

4. Graphpad (prism 6)

جدول ۱. مقایسه  $IC_{50}$  سیلی بینین روی رده سلولی MCF-7 در فواصل زمانی مختلف.

MCF-7		
۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۸۲/۷ug/ml	۱۱۸ug/ml	۸۲/۲۶ug/ml

هریک از نقاط میانگین حاصل بیش از سه آزمون مستقل است ( $P < 0.05$ ).

## References

- می‌یابد [۲۱]. ریحان اختر و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که سیلیبیین بر رده سرطانی کولون HT-29 خواص ضدسرطانی دارد. همچنین سیلیبیین موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات رده‌های AsPC-1 ، BxPC-3 و Panc-1 می‌شود که با القاء آپتوز همراه است [۲۲].
- هم‌راستا با نتایج حاصل از تحقیقات دیگران، نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که سیلیبیین بر رده سرطانی MCF-7 اثر سمی وابسته به دُز و زمان دارد. باتوجه به نتایج MTT سیلیبیین در غلظت‌های بیشتر از ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت بر این رده سلولی اثر مهارکنندگی بر تکثیر سلولی دارد. همچنین مقایسه نتایج حاصل از آزمایش MTT و کاسپاز نشان داد که در غلظت‌های بالای سیلیبیین (بیش از ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) که میزان فعالیت کاسپاز در آن‌ها زیاد است، در نتایج حاصل از آزمایش MTT در میزان زنده ماندن سلول‌ها کاهش معناداری مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از مهم‌ترین ساختارهای مؤثر در فعالیت ضدسرطانی سیلیبیین است که یافته‌های این بررسی آن را تأیید می‌کند.
- در مجموع نتایج حاصل از پژوهش انجام شده مؤید خاصیت پروآپتوتیک سیلیبیین و اثربخشی این ترکیب گیاهی علیه رده سرطانی MCF-7 است. باتوجه به اینکه این پژوهش صرفاً روی رده سرطانی MCF-7 انجام شده است، تأثیر این ترکیب روی سلول‌های طبیعی به بررسی بیشتری نیاز دارد.
- تشکر و قدردانی**
- مقاله حاضر حامی مالی ندارد و از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم المیرا یزدی در رشته علوم سلولی و مولکولی در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران برگرفته شده است.
- [1] Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*. 2010; 32(1-2):35-48. doi: 10.3233/BD-2010-0307
  - [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International Journal of Cancer*. 2001; 94(2):153-6. doi: 10.1002/ijc.1440
  - [3] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast Journal*. 2007; 13(4):383-91. doi: 10.1111/j.1524-4741.2007.00446.x
  - [4] Montazeri A, Vahdaninia M, Harirchi I, Harirchi AM, Sajadian A, Khaleghi F, et al. Breast cancer in Iran: need for greater women awareness of warning signs and effective screening methods. *Asia Pacific Family Medicine*. 2008; 7(1):6. doi: 10.1186/1447-056X-7-6
  - [5] Mousavi SM, Mohagheghi MA, Mousavi-Jerrahi A, Nahvijou A, Seddighi Z. Burden of breast cancer in Iran: a study of the Tehran population based cancer registry. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2006; 7(4):571-4. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.10.6189
  - [6] Cornelis MC, Agrawal A, Cole JW, Hansel NN, Barnes KC, Beaty TH, et al. The Gene, Environment Association Studies consortium (GENEVA): maximizing the knowledge obtained from GWAS by collaboration across studies of multiple conditions. *Genetic Epidemiology*. 2010; 34(4):364-72. doi: 10.1002/gepi.20492
  - [7] Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological Interactions*. 1996; 102(1):17-36. doi: 10.1016/0009-2797(96)03729-5
  - [8] Jung IL. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PloS one*. 2014; 9(4):e95492. doi: 10.1371/journal.pone.0095492
  - [9] Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 93(2):409-15. doi: 10.1016/j.jep.2004.04.017
  - [10] Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010; 29(3):447-63. doi: 10.1007/s10555-010-9237-0
  - [11] Kim S, Lee HS, Lee SK, Kim SH, Hur SM, Kim JS, et al. 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced growth arrest is increased by silibinin by the down-regulation of cyclin B1 and cdc2 and the up-regulation of p21 expression in MDA-MB231 human breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2010; 17(14):1127-32. doi: 10.1016/j.phymed.2010.03.013
  - [12] 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 transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. *Carcinogenesis*. 2006; 27(11):2269-80. doi: 10.1093/carcin/bgl098
  - [13] Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Molecular Carcinogenesis*. 2004; 40(3):143-9. doi: 10.1002/mc.20018

- [14] Zhou L, Liu P, Chen B, Wang Y, Wang X, Internati MC, et al. Silibinin restores paclitaxel sensitivity to paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells. *Anticancer Research*. 2008; 28(2A):1119-27. doi: 10.1186/s12943-015-0331-3
- [15] Momeny M, Malehmir M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Ghadimi H, Shokrgozar MA, et al. Silibinin inhibits invasive properties of human glioblastoma U87MG cells through suppression of cathepsin B and nuclear factor kappa B-mediated induction of matrix metalloproteinase 9. *Anti-cancer Drugs*. 2010; 21(3):252-60. doi: 10.1097/cad.0b013e3283340cd7
- [16] Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96(13):7490-5.
- [17] Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. *Carcinogenesis*. 2004; 25(9):1711-20.
- [18] Momeny M, Khorramizadeh MR, Ghaffari SH, Yousefi M, Yekaninejad MS, Esmaili R, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 591(1):13-20.
- [19] Kim S, Choi JH, Lim HI, Lee S-K, Kim WW, Kim JS, et al. Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2009; 16(6-7):573-80. doi: 10.1016/j.phymed.2008.11.006.
- [20] Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *Journal of Surgical Research*. 2007; 143(1):58-65. doi: 10.1016/j.jss.2007.03.080
- [21] Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncology Reports*. 2004; 11(2):493-9. doi: 10.3892/or.11.2.493
- [22] Ge Y, Zhang Y, Chen Y, Li Q, Chen J, Dong Y, Shi W. Silibinin causes apoptosis and cell cycle arrest in some human pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12(8):4861-71. doi: 10.3390/ijms12084861