

تأثیر داروی سیلی بینین بر فعالیت متابولیکی رده سلولی C₈₃₀₅ در سرطان تیروئید آناپلاستیک

وسیمه وحدتی راد^{۱*}، سید حمیداله غفاری^۲، مجید مومنی^۲، حسین شهبانی ظهیری^۳

^۱دانشگاه پیام نور تهران- گروه زیست شناسی گیاهی
^۲دانشگاه علوم پزشکی تهران - بیمارستان دکتر شریعتی- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و سلولهای بنیادی
^۳پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری - گروه ژنتیک مولکولی
^{*}نویسنده مسئول: دانشگاه پیام نور تهران- گروه زیست شناسی گیاهی

چکیده

سابقه و هدف: سرطان آناپلاستیک تیروئید یکی از بدخیمی های کشنده با شیوع ۲-۱٪ می باشد. تومورهای آناپلاستیک دارای رشد سریع بوده و پاسخ به درمان ضعیفی دارند. در این مطالعه اثر سمی سیلی بینین بر رشد و تکثیر رده سلول C₈₃₀₅ سرطان تیروئید آناپلاستیک مورد بررسی قرار گرفت. سیلی بینین ترکیب اصلی موجود در سیلیمارین است که از گیاه خار مریم استخراج می شود. این ماده دارای اثرات پلیوتروپیک قوی ضد سرطانی در انواع سلول های توموری است.

مواد و روش ها: غلظت های مختلف سیلی بینین شامل ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مول در آزمون MTT (dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide) به سلولهای C₈₃₀₅ اضافه شد. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت فعالیت متابولیکی سلول های تیمار شده با توجه به OD های خوانده شده بوسیله دستگاه ELISA-reader مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان می دهد سیلی بینین دارای اثرسمی معنی داری بر سلولهای رده 8305c می باشد. بطوریکه تیمار سلولها با سیلی بینین در غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مول بمدت ۴۸ ساعت منجر به کاهش قابل ملاحظه و وابسته به دوز و زمان در فعالیت متابولیکی سلول ها می گردد.

نتیجه گیری: با توجه به تاثیر مهاری معنی داری که تیمار سلولها با سیلی بینین بدنال دارد بنظر می رسد که زمینه تحقیقاتی مناسبی برای بهره برداری از گیاه خار مریم در کنترل و درمان سرطانها وجود دارد. تحقیقات بیشتر در دست انجام است تا مکانیسم عمل سیلی بینین در جلو گیری از متاستازی سلول های سرطانی روشن شود.

کلمات کلیدی: سرطان تیروئید آناپلاستیک، سیلی بینین، MTT

مقدمه

می شود (۲،۱۴) سرطان تیروئید آناپلاستیک ۶.۱٪ سرطان های تیروئید را شامل می شود (۱۱،۷). سن درگیری معمولا بین ۶۵-۵۵ سالگی می باشد و اوج ابتلا به این بیماری در ۷۰-۶۰ سالگی است (۳). در حدود ۹۰٪ بیماران مبتلا سنی بیشتر از ۵۰ سال را دارا می باشند و زنان احتمال ابتلا به بیماری را سه برابر بیشتر از مردان دارا می باشند. امروزه بررسی سیتوژنتیک متافاز سرطان تیروئید آناپلاستیک با کمک روش هیبریداسیون ژنومی مقایسه ای با شناسایی حذف و اضافه ژنی در مناطقی از کروموزوم که قبلاً بوسیله سایر روش های سیتوژنتیک یا تکنیک FISH انجام نشده بودند مورد بررسی قرار گرفته است (۶).

سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از بدخیم ترین و کشنده ترین تومور های جامد شناخته شده در انسان می باشد(۱). تومورهای آناپلاستیک دارای رشد سریعی بوده و به سرعت بافت اطراف گلو را در گیری می کنند و پاسخ به درمان ضعیفی دارند. پیش آگاهی در (Anaplastic Thyroid Cancer, ATC) از زمان تشخیص ۴ تا ۱۲ ماه می باشد (۱۶،۱۵). شیوع این سرطان نادر دو نفر از هر یک میلیون فرد در سال می باشد که کمتر از ۲٪ تخمین زده

آدرس نویسنده مسئول: پیام نور تهران

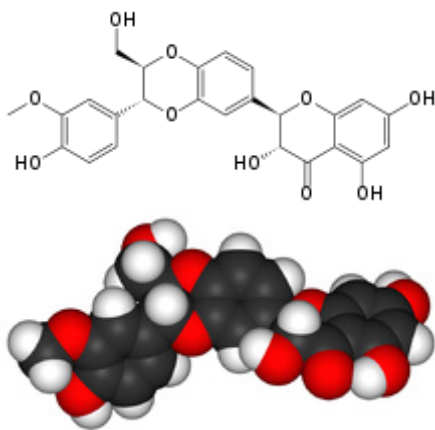
Email: va1_vahdati@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۲

شناسان از دانه های این گیاه برای حفظ و مراقبت از کبد علیه سموم و درمان بیماریهای مزمن آن استفاده می کردند (۱۷،۵) Silybumeburneum گونه شناخته شده تری از خار مریم بوده وعصاره آن در پزشکی کاربرد دارد.

عصاره استخراج شده از این گیاه واجد ۶۵-۸۰٪ سیلی مارین (کمپلکس فلاونوئیدی) و ۲۰-۳۵٪ اسید چرب لینولئیک اسید می باشد (۸). سیلی بینین که به نام سیلی بین نیز شناخته شده است بخش ناخالصی از سیلی مارین می باشد که از دو ایزومر A و B به نسبت ۱:۱ تشکیل شده است (۹،۵). ساختار فضایی سیلی بینین در شکل ۲ نشان داده شده است. سیلی بینین می تواند سلول های کبدی را در مقابل سموم محافظت نماید (۵). بعلاوه سیلی بینین واجد اثرات چند گانه ضد سرطانی قوی در انواع سلول های توموری نظیر پروستات، کلون و مثانه می باشد. اثرات متعدد سیلی بینین علیه انواع سلول های توموری شامل مهار رشد سلول، سنتز DNA، آنژیوژنیزس و نیز القاء آپتوز از طریق مسیر آبشار کاسپاز بدون ایجاد هیچ اثر مضر می باشد. علاوه بر این گزارش شده که سیلی بینین تخریب گسترده بافتی را کنترل می کند (۱۲). این ویژگی های جالب و شفابخشی سیلی بینین را بعنوان یک عامل موثر برای شیمی درمانی انواع مختلف بدخیمی ها معرفی می کند.



شکل ۲: ساختار مولکولی و فضایی سیلیبینین

آزمایش MTT جهت اندازه گیری توان حیاتی سلول و اثرات سایتوتوکسیک آن است. این روش با استفاده از نمک زرد رنگ تترازولیوم (dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide) انجام می شود که محلول در آب می باشد. این نمک

سرطان تیروئید آناپلاستیک دارای درجه بالایی بی نظمی عددی و ساختاری ژنومی است که این ناهنجاری ها سبب تغییرات اساسی در بیان ژن می شود. دارا بودن درجه بالای بی نظمی و نیز نادر بودن این تومورها این موضوع را که کدام یک از این ناپایداری های کروموزومی عامل رشد تومور می باشد را دچار مشکل کرده است. چندین عامل خطر در پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به ATC دخیل می باشد. سن، جنس، اندازه تومور و وسعت بیماری در مسیر بیماری موثر است. تشخیص سرطان تیروئید آناپلاستیک معمولاً در معاینات بالینی و توسط Fine-needle aspiration (FNA) صورت می گیرد. در معاینه بالینی افراد مسن مشاهده توده بزرگی که به سرعت رشد کرده و سفت و غیر متحرک می باشد توجه پزشک را به سمت ATC هدایت می کند. معمولاً توده ها بزرگتر از ۵ سانتی متر بوده و بصورت ندول یک طرفه یا دو طرفه و همراه با علائم فشار و گرفتگی صدا می باشد. در ۹۰٪ موارد تشخیص با روش FNA صورت می گیرد. تست های تشخیصی دیگر نظیر اندازه گیری کلسی تونین سرم، Carcinoembryonic antigen (CEA) ممکن است به تشخیص سرطان تیروئید آناپلاستیک از دیگر فرم های بدخیمی های تیروئید کمک کننده باشد. تست های خونی یا تصویری می تواند به جای بیوپسی مورد استفاده قرار گیرد. درمان کارسینوم آناپلاستیک به طور کلی موقتی است و بندرت قابل درمان و تقریباً همیشه کشنده می باشد. مرگ به دلیل انسداد راه هوایی فوقانی و اختناق تنفسی در نیمی از بیماران صورت می گیرد. جراحی به تنهایی درمان مناسب برای بیماری نمی باشد و باید با شیمی درمانی و پرتو درمانی همراه باشد (۱۰). با این حال عود بیماری و تهاجم گسترده به بافت های اطراف، رایج ترین مشکل در مورد ATC است. بنابراین بررسی داروهای جدید اجتناب ناپذیر می باشد. خار مریم^۱ از جنس SilybumAdans گیاهی گل دار از خانواده گل آفتاب گردان یا آستراسه (Asteraceae) می باشد (شکل ۱). این گیاه بومی نواحی مدیترانه، شمال افریقا و خاورمیانه است. نام Milk thistle از دو ویژگی برگ های آن مشتق شده است. آنها دارای برگ های خالدار سفید رنگ بوده و ویژگی دوم دارای عصاره شیری رنگ می باشد. به مدت ۲۰۰۰ سال گیاه

رویی دور ریخته شد و تیمار با دارو تکرار گردید سپس به آن $110 \mu\text{M}$ DMSO اضافه شد و حدود ۱۰ دقیقه بعد ODها توسط دستگاه ELISA-reader در طول موج 570 nm خوانده شده و درصد سلول های زنده به ترتیب زیر محاسبه شد:

[جذب نوری سلولهای تیمار شده] ÷ [جذب نوری سلولهای کنترل] × ۱۰۰

یافته ها

نتایج حاصل از تست MTT فعالیت متابولیک سلول های رده سلولی ۸۳۰۵ تیمار شده با سیلی بینین در دوز های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مولار بعد از مدت زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت با آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). در نمونه های تیمار شده با سیلی بینین در مقایسه با کنترل کاهش چشمگیری در فعالیت متابولیک مشاهده می گردد. در سلولهای تیمار شده با افزایش غلظت سیلی بینین فعالیت متابولیک سلول ها کاهش می یابد. با توجه به مقادیر جذب نوری بدست آمده بوسیله دستگاه ELISA-reader میزان سمیت سیلی بینین بر روی سلولهای رده ۸۳۰۵ با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

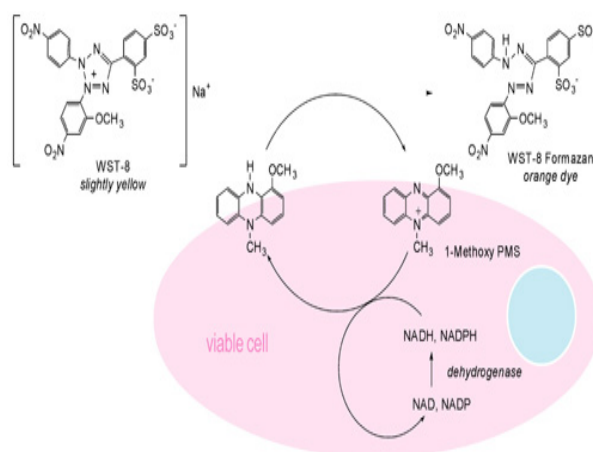
۱۰۰٪ × [(جذب نوری چاهک های

کنترل/جذب نوری چاهک های

آزمایش) - ۱] = درصد سمیت

بر اساس نتایج در نمودار ۱، اثر سمیت سیلی بینین بر رشد سلولهای سرطانی وابسته به دوز و زمان می باشد. یعنی با افزایش غلظت سیلی بینین و یا افزایش زمان تیمار سلولها میزان سمیت این ماده افزایش می یابد. در مدت ۲۴ ساعت تیمار سلولها با سیلی بینین، تنها غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار اثر مهار کنندگی معنی داری بر رشد سلولها نشان می دهند. در حالیکه در تیمارهای ۴۸ ساعته، اثر سیلی بینین در غلظت ۵۰ میکرومولار نیز بطور چشمگیری افزایش نشان می دهد. بیشترین اثر سمی سیلی بینین بر رده سلولی ۸۳۰۵ در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار و بعد از گذشت ۴۸ ساعت مشاهده گردید.

از طریق اندوسیتوز جذب سلول می شود و توسط آنزیم های میتوکندیایی و سیتوزولی به فرمازان احیاء می شود که قرمز رنگ و نا محلول است و جذب نوری آن بوسیله اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می شود (شکل ۳). میزان تشکیل فرمازان با میزان رشد و بقاء سلول ها ارتباط دارد (۱۷). به منظور بررسی اثر توکسیسیته سیلی بینین بر مهار رشد و تکثیر رده سلولی ۸۳۰۵ از این آزمون استفاده شد.



شکل ۳: احیای رنگ MTT به فورمازون

مواد و روش ها

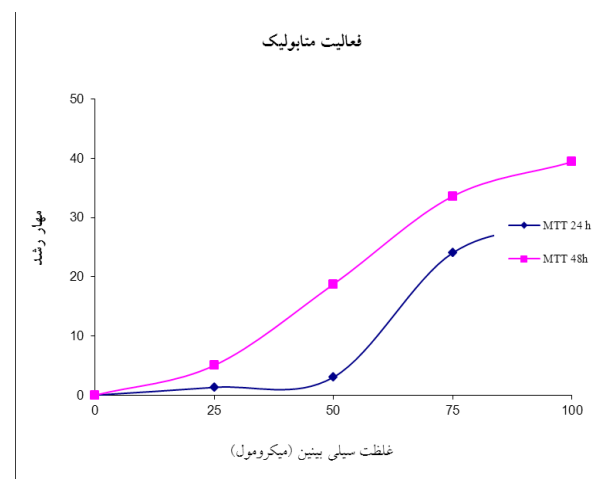
کشت سلولی

رده سلولی ۸۳۰۵ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد. سلول ها، در محیط RPMI (1-گلوکوتائینون) کشت داده شدند. آنتی بیوتیک به صورت مخلوطی از پنی سیلین به مقدار ۱۰۰ واحد در میلی لیتر (برای جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت) و استرپتومایسین به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی متر (برای جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی) به محیط کشت افزوده شد. در نهایت برای کشت سلولی، سرم جنین گاوی به نسبت ۱۰ درصد به محیط افزوده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. تست MTT جهت اندازه گیری توان حیاتی سلول و اثرات سمی (سایتوتوکسیک) سیلی بینین بر مهار رشد و تکثیر رده سلولی ۸۳۰۵ از این آزمون استفاده شد. برای ساخت محلول MTT، ۵ میلی گرم از پودر این ماده در ۱ سی سی محیط RPMI 1640 بدون FBS حل گردید و سلول ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با سیلی بینین تیمار شده در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد و دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه شدند. در روز بعد مایع

جدول ۱: نتایج ODهای خوانده شده توسط دستگاه ELISA-reader پس از انجام تست MTT بر روی سلولها تیمار شده با دوز های متفاوت سیلیبینین

دوز سیلی بینین (میکرومولار)	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت	
	OD	MTT	OD	MTT
۰ (۱)	۰/۷۰۰	۰/۹۴۲	۰/۷۰۰	۰/۹۴۲
۰ (۲)	۰/۷۱۱	۰/۹۹۳	۰/۷۱۱	۰/۹۹۳
۰ (۳)	۰/۶۱۱	۰/۹۵۱	۰/۶۱۱	۰/۹۵۱
۲۵ (۱)	۰/۷۶۰	۰/۹۲۱	۰/۷۶۰	۰/۹۲۱
۲۵ (۲)	۰/۶۷۵	۰/۹۵۲	۰/۶۷۵	۰/۹۵۲
۲۵ (۳)	۰/۶۳۰	۰/۸۶۸	۰/۶۳۰	۰/۸۶۸
۵۰ (۱)	۰/۶۲۴	۰/۷۵۱	۰/۶۲۴	۰/۷۵۱
۵۰ (۲)	۰/۶۵۲	۰/۷۵۳	۰/۶۵۲	۰/۷۵۳
۵۰ (۳)	۰/۶۷۴	۰/۷۸۶	۰/۶۷۴	۰/۷۸۶
۷۵ (۱)	۰/۴۵۱	۰/۷۶۵	۰/۴۵۱	۰/۷۶۵
۷۵ (۲)	۰/۵۳۴	۰/۷۴۹	۰/۵۳۴	۰/۷۴۹
۷۵ (۳)	۰/۵۶۳	۰/۷۰۲	۰/۵۶۳	۰/۷۰۲
۱۰۰ (۱)	۰/۴۶۴	۰/۵۲۱	۰/۴۶۴	۰/۵۲۱
۱۰۰ (۲)	۰/۵۰۲	۰/۶۱۷	۰/۵۰۲	۰/۶۱۷
۱۰۰ (۳)	۰/۴۷۸	۰/۶۱۱	۰/۴۷۸	۰/۶۱۱

با استفاده از نرم افزار excel مقدار عددی سمیت سلولی و مهار رشد برای همه نمونه های سلولی محاسبه شد و نتایج حاصل در نمودار ۱ ارائه شده اند. با توجه به این نمودار، هرچه سلولها زمان طولانی تری با داروی سیلی بینین تحت تیمار قرار گیرند میزان رشد آنها کمتر می شود. همچنین در دوزهای بالاتر ممانعت از رشد سلولی سریعتر و به میزان بیشتری صورت می گیرد. نمودار زیر نمایانگر مؤثر بودن داروی سیلی بینین در مهار رشد سلولهای سرطانی می باشد.



نمودار ۱: میزان مهار رشد سلولی با سیلیبینین بر اساس متغیرهای دوز و مدت زمان تأثیر دارو بر روی سلولها

بحث

در این پروژه نشان داده شد که تیمار رده سلولی C8305 سیلی بینین می تواند سبب مهار یا کاهش فعالیت متابولیک

گردد. در سال ۲۰۰۳ نشان داده شد که سیلی بینین دارای خواص ضد سرطانی گسترده ای می باشد. بعنوان مثال از طریق افزایش بیان مهار کننده های کیناز های وابسته به سایکلین می تواند منجر به توقف چرخه سلولی در رده های سرطانی کولون شود(۱). در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت نشان داده شد که سیلی بینین سبب مهار تکثیر سلول های HepG-2 کبدی می گردد و با افزایش غلظت بکار رفته اثر مهار آن نیز افزایش می یابد (۱۳). همچنین سیلی بینین به طور موثری سبب مهار رشد سلول های HepG2 می شود و به طور نسبتاً قوی اثر سمی بر روی سلول های Hep3B دارد که با القاء آپتوز همراه است (۱۸). سیلی بینین در سلول های HepG2 سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G1 و در سلول های Hep3B سبب توقف عبور از مرحله G2 به M می شود. مطالعات نشان داده اند که سیلی بینین سبب القاء مرحله kip1/p27 می گردد اما سایکلین های D1, D3، E و سایکلین های وابسته به کیناز سلول های Hep3B، سیلی بینین باعث کاهش سطوح پروتئین های تنظیم کننده G2 و M می گردد. علاوه بر این، سیلی بینین سبب مهار فعالیت کینازهای CDK-2، CDK-4 و CDC2 در سلول های HCC می گردد (۱۸).

در تحقیقاتی که توسط تیاگی و همکاران بر روی رده سلولی MCF-7 و MDA-MB468 در سرطان سینه صورت گرفت نشان داده شد که اثر سینرژیک سیلی بینین همراه با دوکسوروبیسین سبب مهار رشد این رده های سلولی می شود و نتایج این مطالعات پیشنهاد می کنند که سیلی بینین می تواند به همراه داروهای سیتوتوکسیک رایج در درمان سرطان سینه بکار گرفته شود. همچنین استفاده همزمان از سیلی بینین و سیسپلاستین یا کاربوپلاتین اثر سمی وابسته به دوز را بر روی رده سلولی سرطان پستان اعمال خواهد کرد (۱۹).

نتایج پروژه اخیر نشان می دهند که سیلی بینین بر روی رده سلولی C8305 اثر سمی داشته و با افزایش غلظت سیلی بینین اثر سمی آن نیز بیشتر می شود. چنانچه اشاره شد اثر سمی سیلی بینین بر رده سلولی C8305 با افزایش غلظت سیلی بینین افزایش می یابد. تفاوت بین نتایج این پروژه با تحقیقات دیگران می تواند نشان دهنده اثر متفاوت این ترکیب بر رده های سلولی

مختلف باشد. یعنی در واقع سیلی بینین دارای ویژگی وابسته به سلول (Cell – type specific) نیز می باشد. در تحقیق حاضر نشان داده شد که سیلی بینین در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومول در مدت ۲۴ ساعت به ترتیب باعث ۱/۳۳، ۳/۰۴، ۲۴/۰۵ و ۲۹/۱۴ درصد کاهش فعالیت متابولیک در رده سلولی ۸۳۰۵ می گردد. در حالیکه در همین غلظت ها ولی در مدت ۴۸ ساعت میزان کاهش فعالیت متابولیک در این رده سلولی بترتیب ۵/۰۳، ۱۸/۷۵، ۳۳/۶۲، ۳۹/۵ می باشد. بنابراین می توان چنین نتیجه گیری کرد که سیلی بینین ممکن است اثر قابل توجهی در درمان سرطان تیروئید داشته باشد. برای چنین نتیجه گیری انجام آزمایشات تکمیلی بصورت *in vitro* و *in vivo* مورد نیاز می باشند.

- 1-Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburge M, Sclafani RA, Agarwal R. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*, 2003; 22: 8271-8282.
- 2-Ain KB. Anaplastic thyroid carcinoms: a therapeutic challenge. *Seminars in Surgical Oncology* 1999;16:64-69.
- 3-Ain KB. Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches. *Thyroid*, 1998; 8:715 – 26.
- 4-SegevDL, Umbricht C, Zeiger MA. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol*, 2003;12: 69-90.
- 5- Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin inhibitions proliferation and promotes cell – cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res*, 2007;143: 58 – 65.
- 6- Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH) – arrays pave the way for identification novel cancer – related genes. *Cancer Sci*, 2004; 95: 559–563.
- 7- Kebebew E, Clark OH, Greenspan FS, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*, 2005; 103: 1330–1335.
- 8- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature : why it matters in cancer researcher and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther*, 2007; 6:158 -168.
- 9- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer researcher and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther*, 2007; 6: 110-119.
- 10- Kuma V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins basic pathology. Saunders, Elsevier; 8th edition, 2007.
- 11- Landis SH , Murray T, Bolden S, Wing PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 1998; 48: 6-29.
- 12- Mohan S, Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen–activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cell. *Biochem Bioph Res Co*, 2004; 320:183–189.
- 13- Momeny M, Khorramizadeh MR, Ghaffari SH, Yousefi M, Yekaninejad MS, Esmacili R, Jahanshahi Z, Nooridalooi MR. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Eur J Pharmacol*, 2008; 591: 13–20.
- 14- Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, et al. (eds.). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/, based on November 2005 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2006.
- 15- Spires JR, Schwartz MR, Miller RH. Anaplastic thyroid carcinoma: association with differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol*, 1988; 114: 40–44.
- 16- Tallroth E, Wallin G, Lundell G, Lowhagen T, Einhorn J. Multimodality treatment in anaplastic giant cell thyroid carcinoma. *Cancer*, 1987; 60: 1428–1431.
- 17- Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle. *Integr Cancer Ther*, 2007; 6: 146–157.
- 18- Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 8441.
- 19- 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. *Oncol Rep*, 2004; 2: 493-499.