اثرضد سرطانی فراکشن های حاصله از زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر رده سلولی سرطان گلیوبلاستومای مغز

محمد رضا زارعی نژاد[۱]،رویا میرزایی[۲]،کامران پوشنگ باقری[۲*]، دلاور شهباززاده[۲*]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ایران، واحد دامغان - ایران
۲-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران – ایران

***نشانی برای مکاتبه:** آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۰۷۸۰، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱. پست الکترونیک: shahbazzadeh@yahoo.com، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: دی نود و پنج پذیرش برای چاپ: اسفند نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *زهر بعضی از عقرب ها حاوی پپتید های ضد سرطان است که یک عامل مهم در توسعه درمانی برای مقابله با سرطان می باشد. هدف از این تحقیق، تخلیص فراکشن های زهر عقرب ایرانی همیسکورپیوس لپتوروس به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعیین اثر ضد سرطانی فراکشن های بدست آمده بر رده سلولی سرطان مغز بود.*

روش کار: *زهر عقرب آماده سازی شده و بعد از تعیین غلظت، فراکشن های آن با کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از رزین سفادکس G۵۰ جدا سازی شده و با سیستم فریز درایر خشک گردید. غلظت فراکشن ها تعیین شده و محدوده وزن مولکولی آنها با SDS-PAGE بررسی گردید. سلول سرطان مغز U-۸۷ MG در محیط DMEM با ۱۰٪ FBS (Fetal Bovin Serum) کشت داده شد. اثر ضد سرطانی فراکشن های بدست آمده بر رده سلولی سرطان مغز U-۸۷ MG در غلظت های مختلف با استفاده از روش MTT بررسی گردید.*

یافته ها: *از ژل فیلتراسیون تعداد ۷ فراکشن مشاهده گردید. فراکشن چهارم دارای پپتید بوده و جهت بررسی اثر ضد سرطانی انتخاب گردید. اثر کشندگی این فراکشن بر رده ی سلول های سرطان مغز در مقدار ۰/۳۱ میکروگرم ۴۷ درصد بر آورد گردید که در همین مقدار دارای اثر توکسیک بر رده ی سلول های شاهد نبود.*

نتیجه گیری: زهر عقرب ایرانی دارای اثر نتیجه گیری:ضد تکثیری و کشندگی بر رده سلولی سرطان مغز U-۸۷ MG ی باشد و هیچ گونه اثر کشندگی و سمیت بر رده ی سلول های شاهد ندارد. استفاده از ترکیبات طبیعی مانند فراکشن های ضد سرطانی که از جانوران سمی استخراج می گردند، می تواند راهگشای مقابله با سرطان باشد. این مطالعه از این لحاظ حائز اهمیت است که اولین گزارش وجود یک عامل ضد سرطانی از زهر عقرب ایرانی بر رده ی سلولی سرطان مغز U- ۸۷ MG می باشد.

واژگان کلیدی : زهر، عقرب ایرانی، کروماتوگرافی، تست **MTT، سرطان مغز رده U – ۸۷ MG.**

مقدمه

سرطان یک فرآیند پویا است که توسط متغیر های متعددی موجب تغییرات ملکولی سلول شده و منجر به تداخل در سیستم تکثیر سلول می شود. اولین تغییر سلولی آشکار در پیدایش سرطان تغییر شکل سلول است(۱). بیش از ۱۰۰ نوع سرطان شناسایی شده است و این سرطانها در هر قسمتی از بدن می توانند تظاهر پیدا کنند. بیش از ۷۰ درصد تمام مرگ های ناشی از کانسر در کشورهای کم درآمد یا با درآمد متوسط اتفاق می افتد. پنج سرطان شایع و کشنده در مردان سراسر جهان شامل سرطان های ریه، معده، کبد،کولورکتال و مری است در حالیکه در زنان سرطان های سینه، ریه، معده ،کولورکتال و سرویکس شایع ترین انواع سرطان می باشند (۲).

مصرف دخانیات بزرگترین و تنها عامل قابل پیشگیری از سرطانها در جهان می باشد. یک پنجم کل سرطان های سراسر جهان با یک عفونت مزمن ویروسی مثل ویروس پاپیلومای انسانی که باعث کانسر سرویکس می شود و یا ویروس هپاتیت بی که منجر به کانسر کبد می شود، در ارتباط است. یک سوم سرطان ها اگر در مراحل اولیه تشخیص داده شوند، قابل درمان هستند(۱). عوامل ژنتیکی، عوامل ایمونولوژیک (نارسایی سیستم ایمنی طبیعی بدن)، داروهای

سرکوبگر ایمنی، عوامل محیطی (تماس با مواد سرطان زا)، ویروسهای القاکننده سرطان و عوامل ترشح هورمونی به ایجاد سلولهای سرطانی کمک می کنند(۳).

برنامه درمانی عمدتاً بستگی به نوع و مرحله سرطان دارد. پزشکان همچنین سن و سلامت عمومی بیمار را در نظر می گیرند. هدف از درمان اغلب بهبود کامل سرطان است. در غیر اینصورت، هدف کنترل بیماری تا حد امکان و کاهش علائم آن است. جراحی، شیمی درمانی، هورمون درمانی، پرتودرمانی، ایمنی درمانی یا درمان بیولوژیکی و فتودینامیک تراپی، شش درمان اصلی سرطان هستند(۲،۳). شیمی درمانی اغلب باعث تاثیرات جانبی منفی شدیدی از قبیل کاهش مقاومت بدن در برابر عفونت، خون ریزی داخلی، اسهال، تهوع، استفراغ، طاسی و آنمی می شود(۴). متاستاز به انتقال سلولهای سرطانی از محل اولیه به بافت های دیگر بدن اطلاق می شود که در مراحل خیلی پیشرفته سرطان ها ایجاد میشود. روند متاستاز موجب می شود که تومور به بافتها و اعضای بدن منتشر شود. وقتی یک تومور سرطانی به مرحله متاستاز برسد، درمان بیمار مشکل می شود(۵).

در سال های اخیر، تعداد مطالعاتی که شواهدی مبنی بر وجود پتانسیل درمانی بسیار بالای بیوتوکسین ها از نظر اثرات ضد توموری و ضد سرطانی و خواص انعقادی را نشان می دهد، رو به افزایش است. این عوامل درمانی در زهر مار ها، زهر زنبور عسل و عقرب، توکسین برخی از باکتری ها و سموم گیاهی یافت شده است. وجود تنوع زیستی در میان جانداران سمی، عملکرد زهر و سموم مختلف با منشاء طبیعی را منحصر به فرد کرده است(۶). استفاده از زهر جانداران سمی از سال ها قبل و بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط کالمت گزارش شده است(۷). تحقیقات Jang و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که زهر زنبور قادر به القا آپوپتوز و مهار بیان سیکلو اکسیژناز(۲-Cox) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H۱۲۹۹ است. آنها نشان دادند که غلظت مشخصی از زهر زنبور قادر به فعال شدن آندونوکلئازها و قطعه قطعه کردن DNA و به دنبال آن القا تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز، افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ و کاهش بیان۲- BCI و کاهش تولید پروستاگلندین ها و مهار انتخابی بیان ۲-Cox می گردد(۸). Conlon و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که زهر مارهای سبز مناطق گرمسیری شرقی (Eastern Green Mamba) بر رده سلولی سرطان ریه انسانی رده A۵۴۹ اثر ضد سرطانی دارند(۹).

با توجه به پتانسیل بالای مواد ضد توموری طبیعی در جانداران و ارزش بالای یافتن این مواد، این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد سرطانی فراکشن پپتیدی بدست آمده از غده زهری عقرب ایرانی *Hemiscorpius lepturus* بر سلول های گلیوبلاستومای مغز انسان انجام شد.

روش بررسی

زهر لیوفیلیزه موجود در انستیتو پاستور ایران- آزمایشگاه ونوم و بیو مولکول های درمانی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۱۰۰ میلی گرم از زهر در بافر آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار به کمک ورتکس حل شد و پس از سانتریفیوژ در دور ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی جهت تزریق به ستون مورد استفاده قرار گرفت.

پس از طی مراحل آماده سازی زهر لیوفیلیزه ، مقدار ۱۰۰ میلی گرم که در ۲ میلی لیتر آمونیوم استات حل شد و به ستون سفادکس G۵۰ تزریق شد و با دستگاه FPLC (شرکت GE - مدلAKTA۱۰) کروماتوگرافی انجام شد. سرعت جریان برابر با یک میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد و فراکشن ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر و به صورت دستی جمع آوری گردیدند.

برای تغلیظ فراکشن ها و تعیین غلظت به روش BCA فراکشن ها ابتدا با ازت مایع منجمد و در دمای ۵۵°C- و فشار۰/۰۳ اتمسفر در دستگاه فریز درایر (شرکت Christ آلمان) لیوفیلیزه و تغلیظ شدند. مقدار پروتئین های موجود در فراکشن ها با استفاده از روش BCA سنجیده شد(۱۰).

برای تعیین وزن ملکولی به روش الکتروفورزSDS- PAGE الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید با ژل ۱۲درصد، بر اساس روش لاملی انجام شد(۱۱).پس از آماده سازی نمونه های پروتئینی، در هر چاهک ۲۰ میکروگرم تزریق شده و در جریان ۳۰ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز گردید.

کشت و نگهداری رده سلولها رده سلول سرطانی U - ۸۷ MG و سلول نرمال HEK۲۹۳ از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM(Gibco) حاوی۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) ، ۲ میلی مولار گلوتامین و محلول پنی سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر)- استرپتومایسین (۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. سپس در انکوباتور۳۷ درجه و در مجاورت Co_2 پنج درصد نگهداری شدند(۱۲،۱۳).

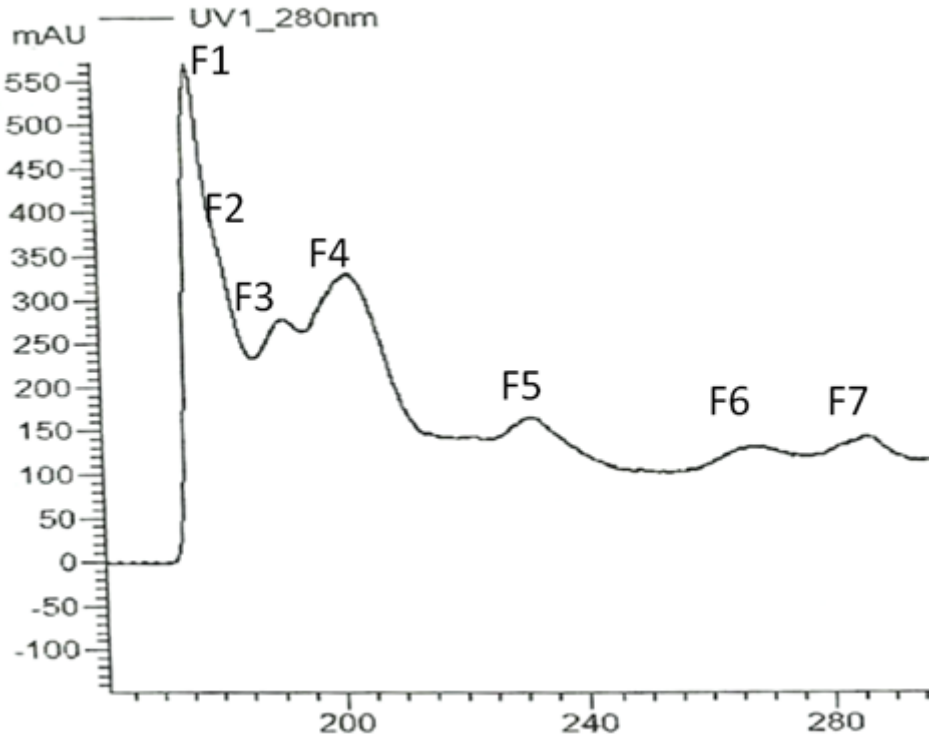
به منظور تعیین اثر سمیت سلولی ماده مورد مطالعه از روش رنگ سنجی با استفاده از نمک تترازولیوم معروف به تست MTT استفاده شد. سپس سلول ها کشت داده شده و تعداد ۲۰ هزار سلول پس از شمارش توسط لام نئوبار، به چاهک های میکروپلیت اضافه گردید. پس از اطمینان از چسبیدن تمامی سلول ها به کف چاهک میکروپلیت، از فراکشن شماره ی ۵ زهر عقرب ایرانی از مقادیر ۶ میکروگرم تا ۰/۱۸ میکروگرم به چاهک ها اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد و ۵٪ Co_2 در انکوباتور قرار داده شدند. در انتها به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت Sigma) و ۱۰۰میکرولیتر محیط کشتRPMI۱۶۴۰ (فاقد فنول رد) اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه گردید. جهت

تعیین جذب نوری هر یک از چاهک ها از دستگاه الایزا ریدر (دستگاه Epoch شرکت BioTek آمریکا) استفاده شد و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای هر غلظت از فراکشن کاندید، ۳ تکرار انجام شد و درصد سمیت سلولی از فرمول زیر محاسبه شد(۱۴، ۱۵).

$$\text{درصد سمیت سلولی} = \left[1 - \frac{\left(OD_{\text{سلول تیمار شده}} - OD_{\text{بلانک}}\right)}{OD_{\text{کنترل}} - OD_{\text{بلانک}}}\right] \times 100$$

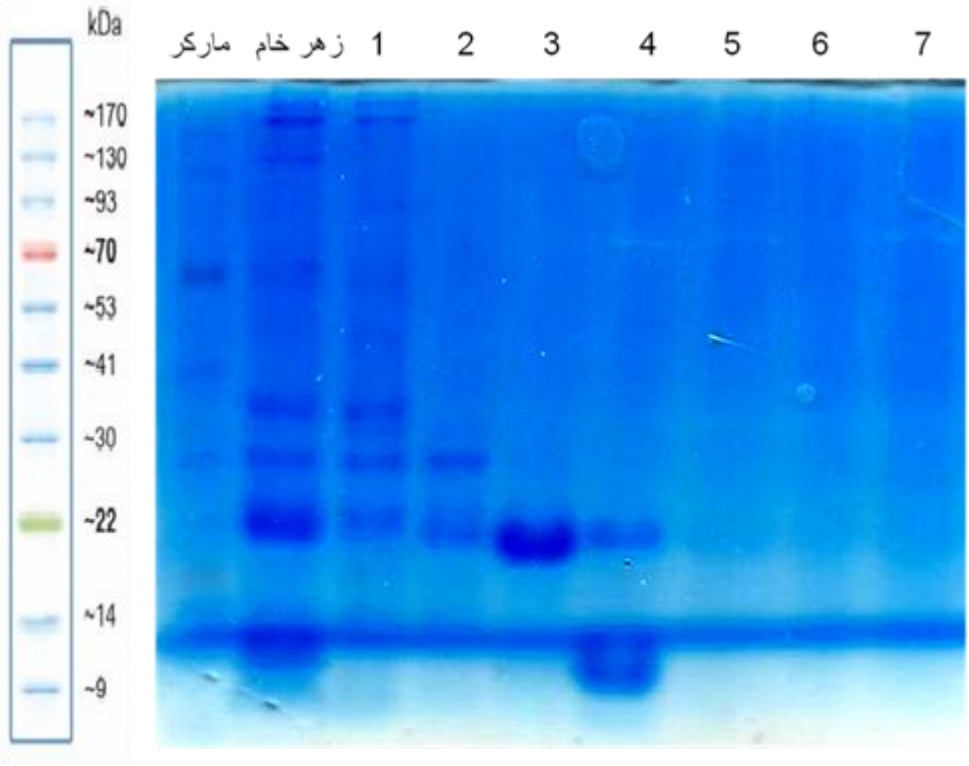
یافته ها

تعداد ۷ فراکشن مشاهده و به روش دستی جمع آوری گردید. بیشترین سطح زیر منحنی مربوط فراکشن های ۱ و ۴ بود. کل پیک ها درمدت زمان ۳۰۰ دقیقه ازستون خارج شدند(شکل۱).



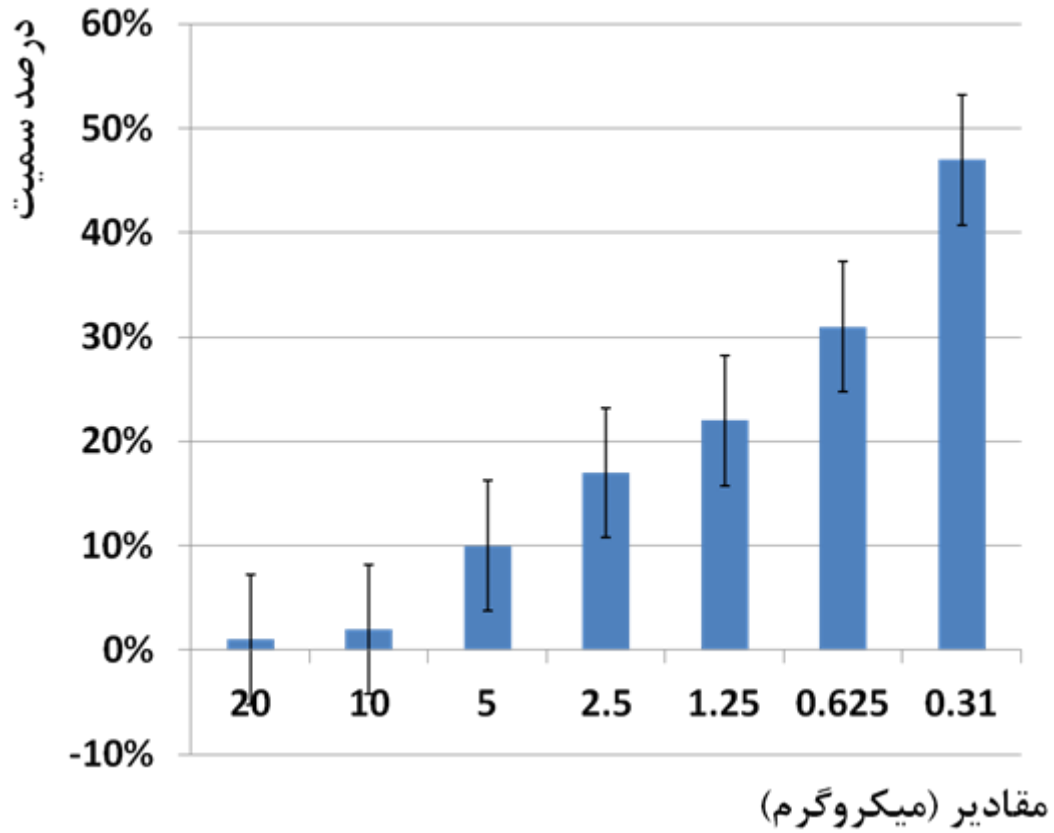
شکل ۱- نمودار فراکشن های بدست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر عقرب ایرانی

الگوی وزن مولکولی فراکشن های تخلیص شده و نتایج بدست آمده از الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) و مارکر استاندارد به کار گرفته شده در شرایط غیر احیا با پلی اکریل امید ۱۲ درصد در شکل۲ نشان داده شده است.



شکل۲- تعیین وزن فراکشن های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون زهر عقرب ایرانی به روش SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲%. فراکشن ۴ دارای بیشترین مقدار پپتید بود.

بررسی اثر فراکشن شماره ی ۴ حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در مقادیر مختلف ۶ ، ۳، ۰/۱،۷۵/۵، ۰/۰،۱۸/۳۷ میکروگرم بر روی سلول نرمال HEK-۲۹۳ و سلول های سرطان مغز رده U-۸۷ MG بیانـگر این بود که فراکشـن ۴ در مـقدار ۰/۳ میـکروگرم بر روی سلول های سرطان مغز رده U-۸۷MG به میزان ۴۷ درصد سمیت سلولی داشته و همچنین در همان مقدار اثر سایتوتوکسیسیتی بر رده ی سلول های شاهد HEK-۲۹۳ ، مشاهده نگردید (شکل۳).



شکل۳- میانگین درصد سمیت فراکشن ۴ بر سلول های سرطان مغز رده U-۸۷ MG با تست MTT.

بحث

سرطان پس از آسیب ژنتیکی به DNA گسترش می یابد. این آسیب ژنتیکی بر روی عملکرد طبیعی سلول از جمله تکثیر سلولی و مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) و ترمیم DNA تاثیر می گذارد و در نهایت منجر به تولید تومور شده و ممکن است که به قسمت های دیگر نیز متاستاز می دهد(۱). سرطان هنگامی که تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی از بین می رود، ایجاد شده و سلول ها و بعد از تکثیر نا به جا منجر به رشد تومور می شود. آپوپتوز و مسیر های سیگنالینگ وابسته به آن دارای اثرات مهاری بر روی پیشرفت سرطان است. در حالی که چندین داروی ضد سرطان و شیمی درمانی وجود دارد که سبب مرگ آپوپتوتیک سلول های سرطانی می شوند اما دارای اثر سمیت غیر انتخابی بر روی سایر بافت ها نیز می باشند(۲۰). آمارهایی که توسط NCI و انجمن سرطان آمریکا در سال ۲۰۱۵ برآورد شده است، سالانه ۲۳۰۰۰ نفر مبتلا به سرطان مغز می شوند که از این ۲۳۰۰۰ نفر ۱۳۰۰۰ نفر جان خود را در اثر ابتلا به این سرطان از دست می دهند(۱، ۲). با توجه به گسترش روز افزون آلودگی و عوامل ایجاد سرطان در شهر ها و کشور های صنعتی و از سویی دیگر افزایش مقاومت افراد مبتلا به سرطان به داروهای شیمی درمانی، پژوهشگران برای مقابله و درمان سرطان در پی یافتن عوامل بیولوژیکی کم خطر با خاصیت ضد توموری از زهر جانوران سمی هستند(۱۴). کشور ایران به دلیل قرار گرفتن در شرایط جغرافیایی نیمه بیابانی و خشک دارای تنوع زیستی بالایی از لحاظ وجود جانوران زهری از جمله عقرب می باشد(۱۶).

زهر عقرب مخلوطی از مواد دارویی فعال است که شامل پلی پپتیدهای آنزیمی و غیرآنزیمی می باشد(۵). بیش از ۱۵۰۰ گونه عقرب شناسایی شده اند، که هر کدام نوع متفاوتی از زهر را تولید می کنند. تخمین زده می شود که در هر نوع زهر حدود ۵۰ الی ۱۰۰ مولکول مختلف پلی پپتیدی وجود داشته باشد(۱۷،۱۸). از ۱۵۰۰ گونه عقرب در دنیا فقط بر روی تعداد کمی به خوبی مطالعه شده است. تا بحال حدود ۲۵۰ پروتئین و پپتید های فعال زیستی شناخته شده اند که بعضی از آن ها خاصیت ضد سرطانی دارند(۱۸).

زهر عقرب به عنوان یک عامل امید بخش در مبارزه با سرطان است، چرا که در هر دو شرایط *in vivo* و *in vitro* دارای اثرات سمی بر روی سلول های سرطانی بوده است و همچنین در فاز ۱ و ۲ آزمایشات بالینی دارای اثرات قابل توجه بوده است. بیشترین پپتید های مورد مطالعه، پپتید های دارای زنجیره بلند متشکل از ۶۰ تا ۷۰ آمینو اسید می باشند که با ۴ پل دی سولفیدی کراس لینک شده اند(۱۸). وجود عوامل ضد سرطانی در زهر خانواده عقرب طی مطالعات محققین دیگر ثابت شده است، لذا هدف از این مطالعه یافتن فراکشن پپتیدی دارای خاصیت ضد سرطانی از زهر عقرب ایرانی بود.

مطالعات انجام شده توسط Yue Ying Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که پلی پپتید های استخراج شده از زهر عقرب (PESV) دارای اثر آپوپتوتیک قابل توجهی بر روی سلول های سرطان پروستات می باشند، اما بر روی سلول های اپیتلیال نرمال پروستات، اثر سمی ندارند(۱۹). Xiaoxiao Guo و همکاران در سال ۲۰۱۳ دو پپتید خطی آلفا هلیکس را از زهر عقرب زرد برزیلی*Tityus serrulatus* از طریق HPLC فاز معکوس جداسازی کرده و پپتید های بدست آمده دارای اثرات آنتی میکروبیال بر روی سویه های مختلف و همچنین دارای اثرات ضد سرطانی وسیعی بر روی سلول های سرطانی انسانی بودند(۲۰). با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می شود که این فراکشن بیشتر تخلیص شده و اثرات ضد سرطانی آن بر سلول های مختلفی مورد ارزیابی قرار گیرد. ارزش بدست آمده از این تحقیق به غیر از اثر ضد سرطانی، عدم سمیت آن بر سلول های نرمال انسان می باشد که نکته بسیار قابل توجهی می باشد. البته باید سمیت این فراکشن بر روی سلول های نرمال دیگری نیز بررسی گردد.

نتیجه گیری

این تحقیق اولین گزارش وجود یک عامل ضد سرطان از عقرب ایرانی همیسکورپیوس لپتوروس می باشد. فراکشن بدست آمده توانست به طور قابل توجهی سلول های سرطان گلیوبلاستومای مغز انسان U-۸۷ MG را از بین برده ولی هیچ گونه سمیتی بر سلول های نرمال مشاهده نشد

REFERENCES

1. Hong WK, Holland JF. Holland Frei cancer medicine eight: PMPH-USA; 2010.
2. Fauci W, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J. Harrison principle of internal medicine. 18th. New York: MC Graw-Hill; 2012.
3. Matthews A, Sikora K. Anni's Cancer Companion: An AZ of Treatments, Therapies and Healing: Singing Dragon; 2011.
4. Fontaine S. Types of chemotherapy drugs and their administration. 2013.
5. Lucena S, Sanchez EE, Perez JC. Anti-metastatic activity of the recombinant disintegrin, r-mojastin 1, from the Mohave rattlesnake. Toxicon. 2011;57(5):794-802.
6. Liu C-C, Yang H, Zhang L-L, Zhang Q, Chen B, Wang Y. Biotoxins for cancer therapy. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2013;15(12):4753-8.
7. Park MH, Jo M, Won D, Song HS, Han SB, Song MJ, et al. Snake venom toxin from Vipera lebetina turanica induces apoptosis of colon cancer cells via upregulation of ROS-and JNK-mediated death receptor expression. BMC cancer. 2012;12(1):1.
8. Jang M-H, Shin M-C, Lim S, Han S-M, Park H-J, Shin I, et al. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. Journal of pharmacological sciences. 2003;91(2):95-104.
9. Conlon JM, Prajeep M, Mechkarska M, Arafat K, Attoub S, Adem A, et al. Peptides with in vitro anti-tumor activity from the venom of the Eastern green mamba, Dendroaspis angusticeps (Elapidae). Journal of venom research. 2014;5:16.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. J Biolchem.. 1951; 193: 265-75
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 .Nature, 1970; 227:680-685

12. Freidberg R. An investigation into the antimicrobial and anticancer activities of Geranium incanum, Artemisia afra and Artemisia absinthium: Nelson Mandela Metropolitan University; 2009.
13. Cree IA. Cancer cell culture: Humana Press; 2011.
14. Ali R, Mirza Z, ASHRAF GM, Kamal MA, Ansari SA, Damanhouri GA, et al. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. Anticancer research. 2012;32(7):2999-3005.
15. Park MH, Jo M, Won D, Song HS, Song MJ, Hong JT. Snake venom toxin from Vipera lebetina turanica sensitizes cancer cells to TRAIL through ROS-and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins. Apoptosis. 2012;17(12):1316-26.
16. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(4):252-71.
17. Lourenço W. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. Compte rendu des séances de la société de biogéographie. 1994;70(3):155-60.
18. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 2000;82(9):861-8.
19. Zhang YY, Wu LC, Wang ZP, Wang ZX, Jia Q, Jiang GS, et al. Anti-proliferation effect of polypeptide extracted from scorpion venom on human prostate cancer cells in vitro. Journal of clinical medicine research. 2009(1):24-31.
20. Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, Tityus serrulatus: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. Biochimie. 2013;95(9):1784-94.