

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

اثر ضد تکثیری سم عقرب ایرانی *Hemiscorpius lepturus* در شرایط برون تنی بر روی رده سلول سرطانی Caco2

زهرا ستایش مهر*

۱- گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه زابل- زابل- ایران، پست الکترونیکی: setayeshmehrz@uoz.ac.ir

چکیده

سم برخی از گونه‌های عقرب باعث ایجاد آپوپتوز و توقف تکثیر در سلول‌های سرطانی می‌شود. از این ویژگی مهم می‌توان در جداسازی ترکیبات دارای اهمیت درمانی در تحقیقات سرطان بهره برد. در مطالعه حاضر، اثرات سیتوتوکسیکیتی دو فرکشن ۲ و ۴ (F2 و F4) جداسازی شده توسط HPLC از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* در شرایط برون تنی مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا سمیت سلولی با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. پس از کشت سلول‌های Caco2 در تست MTT، غلظت‌های مختلف F2 و F4 ($0-180 \mu\text{g/ml}$)، به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس فرآیند آپوپتوز سلولی با اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ توسط تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت هر دو فرکشن، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با F2 و F4 نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار کاهش معناداری داشت ($p<0.05$). میزان IC_{50} برای F2 و F4، به ترتیب، $80/24 \mu\text{g/ml}$ و $74/64 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد. نتایج بدست آمده از بیان ژن نشان داد که بیان ژن‌های Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ سلول‌های سرطانی تیمار شده با دو فرکشن نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار افزایش معناداری داشت ($p<0.05$). در نهایت، افزایش بیان ژن‌های کاسپاز و Bax به دنبال تیمار با هر دو فرکشن خالص سازی شده از سم عقرب، خاصیت آپوپتوتیک F2 و F4 را تایید کرد. این نتایج نشان می‌دهد که سم عقرب *H. lepturus* می‌تواند منبع بالقوه‌ای جهت جداسازی مولکول‌های موثر در فرآیند ضد تکثیر و آپوپتوز سلول‌های سرطانی باشد.

کلمات کلیدی: سم عقرب، *Hemiscorpius lepturus*، MTT، آپوپتوز، بیان ژن

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

۱- مقدمه

سم عقرب خاصیت مهار رشد انواع سرطان را دارد. این سم دارای پپتیدها و پروتئین های مختلفی است که عمدتاً مسئول فعالیت های ضد سرطانی هستند. چندین پپتید با خاصیت ضدسرطانی از سم عقرب گزارش شده است که فعالیت های سیتوتوکسیک نشان می دهند. Chlorotoxin، پپتید جداسازی شده از سم عقرب *Leirus quinquestriatus* به طور اختصاصی به سلول های گلیوما متصل می شود و از متاستاز آنها جلوگیری می کند (۱). وجود Chlorotoxin و فعالیت ضد سرطانی آن نیز از سم *Buthus martensii* Karsch گزارش شده است (۲).

شروع و پیشرفت سرطان، بیشتر به دلیل تقسیم سلولی کنترل نشده و مکانیسم های ناقص آپوپتوز نادرست است و مقاومت سرطان به اقدامات شیمی درمانی رایج به دلیل خاصیت گریز از فرآیند آپوپتوز ایجاد می شود. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلولی است که شروع آن به دلیل عوامل متعددی است که مجموعه ای از رویدادهای درون سلولی را شامل می شوند و در نهایت سبب پایان بقای سلول می شود. توقف چرخه سلولی در نقاط واریسی مختلف منجر به فعال شدن مسیرهای درون سلولی می شود که به فرآیند آپوپتوز ختم می شود. دو مسیر اصلی بیرونی و درونی آپوپتوز وجود دارد (۳). مسیر بیرونی شامل فعال شدن آبشار مرگ است، در حالی که مکانیسم درونی و ذاتی آپوپتوز، شامل میانجی گری اندامک میتوکندری در سلول است که با از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری، آزادسازی سیتوکروم c (Cyt c) و متعاقباً "فعال سازی کاسپازها مشخص می شود. کاسپاز ۹ فعال شده، پروکاسپاز ۳ را در پایین دست خود به کاسپاز ۳ فعال تبدیل کرده و متعاقباً پلی (ADP-ریبوز) پلیمرز (PARP) را می شکند. مشخص شده است که خانواده پروتئین های Bcl-2، یکی از مهم ترین واسطه های آبشار مرگ میتوکندریایی است. در طول فرآیند آپوپتوز، بیش از حد تنظیم ژن Bax با تنظیم پایین ژن Bcl-2 همراه است (۳). در سرتاسر جهان، تلاش های زیادی برای کشف مولکول های جدیدتر مبتنی بر منابع طبیعی با خاصیت ضدسرطانی در حال انجام است. با توجه به اهمیت خواص دارویی و پزشکی سم عقرب ها، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سمیت سلولی دو فرکشن ۲ و ۴ جداسازی شده از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* و همچنین بررسی بیان ژن های دخیل در آپوپتوز از جمله، Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه، اولترافیلتراسیون و HPLC

ابتدا گونه عقربی *Hemiscorpius lepturus*، از خوزستان جمع آوری شدند. از طریق تحریک الکتریکی دم جاندار، سم عقرب مورد نظر تهیه گردید. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه، از دستگاه اولترافیلتراسیون با cut-off ۳۰۰۰ دالتون جهت جداسازی پپتیدهای مناسب استفاده شد. مایع بدست آمده در دستگاه فریز درایر خشک گردید. جهت خالص سازی پپتیدهای موجود در سم عقرب، از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) دارای ستون C-18 استفاده شد. پس از عبور سم از ستون، در نهایت طول موج ۲۱۴ nm جهت اندازه گیری میزان جذب پیک ها استفاده گردید. دو پیک شماره ۲ و ۴ جمع آوری و توسط فریز درایر خشک گردیدند (۴).

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۶-۵ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

۲-۲- ارزیابی سمیت سلولی توسط سنجش MTT

ابتدا سلول‌های سرطانی Caco2 از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند و در محیط کشت RPMI164 با ۱۰ درصد آلبومین سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند. آنتی‌بیوتیک‌های اضافه شده ۱۰۰ units/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین بودند. سپس سلول‌ها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷°C نگهداری شدند. سلول‌های Caco2 در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای با تراکم سلولی 1×10^4 cells/well کشت داده شدند، غلظت‌های مختلف فرکشن‌های ۲ و ۴ (۱۸۰-۰ µg/ml)، به هر چاهک اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت تیمار گردیدند. سپس با ۲ µl محلول MTT، به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درصد زنده‌مانی سلولی محاسبه گردید (۴).

۲-۳- تهیه cDNA و انجام Real Time PCR

در ابتدا، سلول‌ها تحت تیمار ۲۴ ساعته با فرکشن‌های ۲ و ۴ قرار گرفتند. مایع رویی پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ خارج شد. سپس RNA کل توسط کیت شرکت کیازن طبق دستورالعمل شرکت استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ بررسی گردید. بلافاصله RNA مورد نظر توسط کیت شرکت فرمنتاز، طبق دستورالعمل شرکت تبدیل به cDNA شد. کمیت cDNA تهیه شده با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. جدول ۱ آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد (جدول ۱). جهت اندازه‌گیری بیان ژن، تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از Real Time PCR صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی توسط اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس با استفاده از دستگاه ABI 7300 صورت گرفت. داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شد و تجزیه و تحلیل گردید.

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism 9 انجام شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA یک طرفه) و سپس Tukey برای مقایسات چندگانه استفاده گردید. سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ تعیین گردید.

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

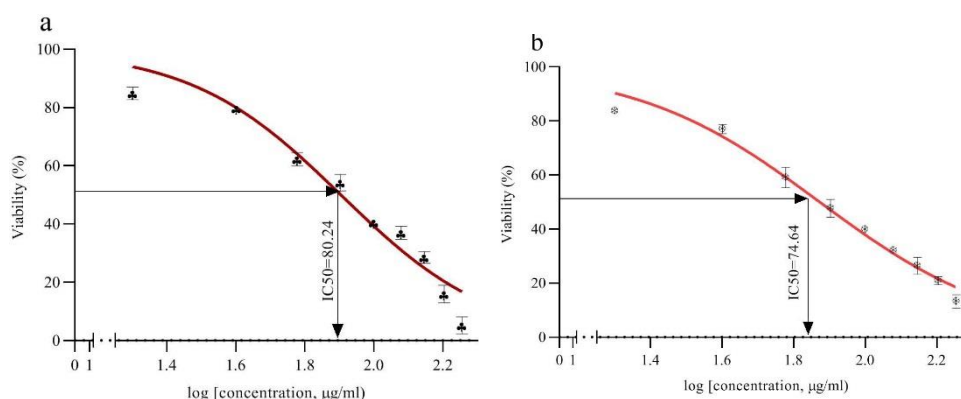
۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

جدول ۱. توالی آغازگرهای ژنهای مورد مطالعه

ژن	توالی آغازگرها
GAPDH	5' F: AGCCAAAAGGGTCATCATC 3' 5' R: TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG 3'
Bax	5' F: CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAC 3' 5' R: CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC 3'
Bcl-2	5' F: GATGTGATGCCTCTGCGAAG 3' 5' R: CATGCTGATGTCTCTGGAATCT 3'
Cyt c	5' F: AAGGGAGGCAAGCACAAAGACTG 3' 5' R: CTCCATCAGTGTATCCTCTCCC 3'

۳- نتایج

نتایج مربوط به سمیت سلولی نشان داد که رابطه معکوسی میان درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کولورکتال Caco2 تیمار شده با غلظت های دو فرکشن ۲ و ۴ وجود داشت، به طوریکه با افزایش غلظت F2 و F4، درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی تیمار شده نسبت به سلولهای بدون تیمار کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$). مقادیر IC_{50} ، برای فرکشن ۲ و ۴، به ترتیب، $80.24 \mu g/ml$ و $74.64 \mu g/ml$ بدست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. منحنی های دوز-پاسخ اثر غلظت های مختلف فرکشن ۲ (a) و فرکشن ۴ (b) بر روی سلول های سرطان کولورکتال Caco2 در زمان ۲۴ ساعت

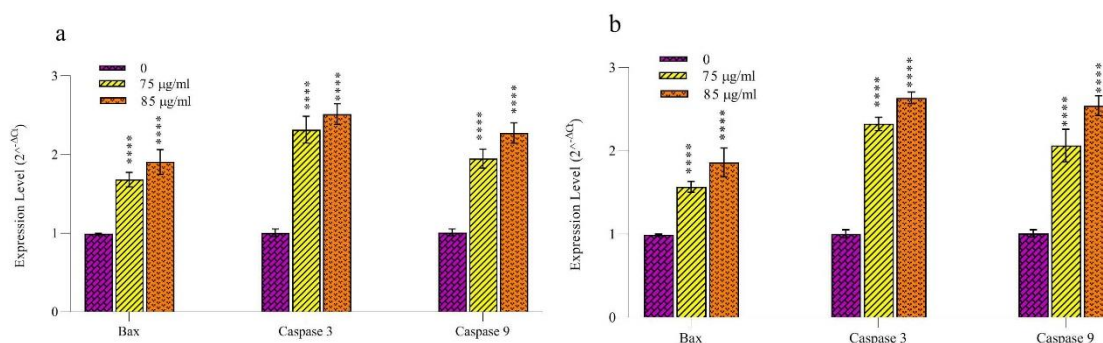
همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت دو فرکشن ۲ و ۴، بیان ژن های Bax، کاسپاز ۳ و ۹ افزایش معناداری یافت ($p < 0.05$). همانطوریکه در شکل مشخص است، بیشترین مقدار کاهش در بیان ژن، مربوط به ژن کاسپاز ۳ سلول های سرطانی Caco2 تیمار شده با غلظت $85 \mu g/ml$ فرکشن ۴ می باشد (شکل ۲).

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان



شکل ۲. میزان بیان ژن در سطح mRNA ژنهای Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ سلولهای سرطانی کولورکتال Caco2 تیمار شده با F2 (a) و F4 (b) استخراج شده از سم عقرب. **** ($p < 0.0001$)، بیانگر وجود اختلاف معنادار میان بیان ژن سلولهای سرطانی تیمار شده با غلظت های ۷۵ و ۸۵ دو فرکشن ۲ و ۴ نسبت به بیان ژن سلولهای سرطانی بدون تیمار می باشد.

۴- بحث

زهر عقرب منبع طبیعی جالبی برای درمان سرطان است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر دو فرکشن استخراجی از سم عقرب *H. lepturus* بر روی سلولهای سرطانی کولورکتال انسانی Caco2 انجام شد. قرار گرفتن در معرض فرکشن های خالص سازی شده، نشان دهنده سمیت سلولی قابل توجهی در برابر سلول های سرطانی کولورکتال بود. میزان IC₅₀، برای فرکشن ۲ و ۴، به ترتیب، ۸۰/۲۴ μg/ml و ۷۴/۶۴ μg/ml گزارش شد. برخی گزارشات، اثرات سیتوتوکسیک سموم عقرب های مختلف را نشان داده اند. سم BMK سمیت سلولی قابل توجهی را در برابر به رده سلولی سرطانی مغز U251-MG نشان داده است، در حالی که هیچ سمیتی بر روی سلول های طبیعی نداشت (۵). سم و پپتیدهای عقرب *Tytilus discrepans* اثر ضد سرطانی بر روی رده سلولی سرطان سینه SKBR3 نشان دادند و هیچ اثری بر روی رده سلولی طبیعی کلیه MA104 مشاهده نشد (۶) که هر دو نوع بافت شناسی در مطالعه ما گنجانده شده بودند. این شواهد، مشابه شواهد به دست آمده در این مطالعه، از خاصیت ضد سرطانی سم عقرب در برابر سرطان کولورکتال Caco2 حمایت می کند.

در مطالعه حاضر، مرگ سلولی آپوپتوز ناشی از دو فرکشن استخراجی از سم عقرب *H. lepturus* در سلول های Caco2، شامل تنظیم بالای ژن های Bax و کاسپازهای ۳ و ۹ و متعاقباً "فعال سازی کاسپازها بود. نتایج ما نشان داد که بیان ژن های Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ افزایش یافته است؛ احتمالاً نشان دهنده این مطلب است که آپوپتوز با واسطه میتوکندری در مرگ سلولی ناشی از دو فرکشن جداسازی شده از سم عقرب در سلول سرطانی Caco2 نقش دارد. در فرآیند آپوپتوز وابسته به میتوکندری، افزایش بیان ژن Bax، باعث جا به جایی Bax در غشای خارجی میتوکندری شده، همودایمرهای Bax در غشای میتوکندری ایجاد شده و متعاقباً "سبب آزادسازی عوامل آپوپتوژنیک مثل Cytc می شود (۷). این مرحله کاسپاز ۹ آغازگر و کاسپاز ۳ عمل کننده را فعال می کند که نقش کلیدی را در مسیرهای آپوپتوز ایفا می کنند (۸). کاسپازها، خانواده ای از سیستمین

18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

هجدهمین همایش ملی و سومین همایش
بین المللی بیوشیمی فیزیک ایران

25-26 Des, 2024, University of Hormozgan

۶-۵ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

پروتئازها هستند که اجزای جدایی ناپذیری از مسیر آپوپتوز را تشکیل می دهند. کاسپازهای عمل کننده، مانند کاسپاز ۳ معمولاً توسط کاسپازهای بالا دست خود یعنی کاسپازهای ۸ و ۹، به صورت پروتئولیتیکی فعال می شوند. کاسپاز ۳ فعال شده، سبب شکافتن DNA و قطعه قطعه شدن آن شده که جز مشخصه فرآیند آپوپتوز است (۹).

۵- نتیجه گیری

افزایش بیان ژن های Bax، کاسپازهای ۹ و ۳ نشان دهنده این مطلب است که دو فرکشن ۲ و ۴ جداسازی شده از سم عقرب *H. lepturus* می توانند اثرات سیتوتوکسیک خود را از طریق مسیر آپوپتوز میتوکندریایی در سلول های سرطانی کولورکتال Caco2 اعمال کنند.

مراجع

- [1] Yang JB, Li XW, Dong WH, Kong TH, Song HX, Zheng XY, Liu GT. Effect of anticancer polypeptide from *Buthus Martensii* venom on immune function in the H22-bearing mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*; 25(12): 736-739, 2000.
- [2] DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol*; 264(2): 361-369, 1993.
- [3] Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*; 28(2): 233-239, 2007.
- [4] Setayesh-Mehr Z, Asoodeh A. Biochemical characterization of HL-7 and HL-10 peptides identified from scorpion venom of *Hemiscorpius lepturus*. *Int J Pept Res Ther*; 24: 421-430, 2018.
- [5] Wang WX, Ji YH. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vivo* and inhibits glioma tumor growth *in vitro*. *J Neurooncol*; 73(1): 1-7, 2005.
- [6] D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*; 56(8): 1497-1505, 2010.
- [7] Renault TT, Teijido O, Antonsson B, Dejean LM, Manon S. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer. *Int J Biochem Cell Biol*; 45(1): 64-67, 2013.
- [8] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*; 2012; 45(6): 487-498, 2012.
- [9] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*; 326(1): 1-16, 1997.

Antiproliferative effect of Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* venom *in vitro* on Caco2 cancer cell line

Zahra Setayesh-Mehr^{1*}

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran, Email:
setayeshmehr@uoz.ac.ir

Abstract

The venom of some species of scorpions causes apoptosis and stops the proliferation of cancer cells. This important feature can be used in the isolation of therapeutically important compounds in cancer research. In the present study, the cytotoxicity effects of two fractions 2 and 4 (F2 and F4) separated by HPLC from *Hemiscorpius lepturus* venom were evaluated *in vitro*. First, cytotoxicity was evaluated using MTT assay. After cultivating Caco2 cells in MTT test, different concentrations of F2 and F4 (0-180 µg/ml) were added to each well and treated for 24 hours. Then the process of cell apoptosis was investigated by measuring the expression of Bax genes, caspases 3 and 9 by Real Time PCR technique. The results showed that by increasing the concentration of both fractions, the survival percentage of cancer cells treated with F2 and F4 decreased significantly compared to untreated cancer cells ($p < 0.05$). The IC₅₀ values for F2 and F4 were 80.24 µg/ml and 74.64 µg/ml, respectively. The results of gene expression showed that the expression of Bax, caspase 3 and 9 genes in cancer cells treated with two fractions increased significantly compared to untreated cancer cells ($p < 0.05$). Finally, the increased expression of caspase and Bax genes after treatment with both purified fractions of scorpion venom confirmed the apoptotic properties of F2 and F4. These results show that *H. lepturus* scorpion venom can be a potential source for isolating effective molecules in the process of anti-proliferation and apoptosis of cancer cells.

Keywords: scorpion venom, *Hemiscorpius lepturus*, MTT, apoptosis, gene expression