

اثرات دو فرکشن جداسازی شده از سم عقرب در مهار تکثیر و القای آپوپتوز رده سلول سرطانی HepG2

زهرا ستایش مهر*

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

چکیده

سم عقرب از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله القای آپوپتوز سبب مهار و سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود. در مطالعه حاضر، فعالیت دو فرکشن حاصل از کروماتوگرافی HPLC سم عقرب *Hemiscorpius lepturus*، در شرایط برون‌تنی بررسی گردید. در مرحله اول، اثرات سیتوتوکسیک فرکشن‌های ۲ و ۴ (F2 و F4) خالص سازی شده از سم عقرب با استفاده از تست MTT سنجش گردید. بدین صورت که، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف F2 و F4 (۵۰-۰ $\mu\text{g/ml}$)، به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در مرحله دوم، فرآیند مرگ سلولی از طریق تکنیک Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز ارزیابی شد. در مرحله سنجش بیان ژن، سلول‌های سرطانی با دو غلظت از F2 (۱۵ و ۲۰ $\mu\text{g/ml}$) و F4 (۳۰ و ۳۵ $\mu\text{g/ml}$) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش غلظت فرکشن‌های خالص سازی شده، با کاهش معناداری در درصد زنده‌مانی سلولی همراه است ($p < 0.05$) و گزارش شد که F2 در غلظت ۲۰/۴۱ $\mu\text{g/ml}$ و F4 در غلظت ۳۷/۵۴ $\mu\text{g/ml}$ ، سبب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شدند. نتایج مربوط به بیان ژن نشان داد که افزایش غلظت هر دو فرکشن با افزایش معنادار در بیان ژن‌های Bax و سیتوکروم c همراه بود، در حالی که بیان ژن Bcl-2 کاهش داشت ($p < 0.05$). در مجموع، به نظر می‌رسد که اثر سیتوتوکسیک دو فرکشن حاصل از سم عقرب با اثر القای آپوپتوز آن‌ها از طریق مسیر میتوکندریایی مرتبط است. بنابراین، سم عقرب *H. lepturus* ممکن است یک عصاره طبیعی و جالب برای تحقیقات بیشتر در استراتژی‌های درمان سرطان کبد باشد.

واژه‌های کلیدی: سم عقرب، *Hemiscorpius lepturus*، زنده مان، 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

در سراسر دنیا، یکی از مشکلات عمده در بهداشت عمومی بیماری سرطان است. سرطان از دومین عوامل تاثیر گذار در مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین علت مرگ و میر در کشورهای کمتر توسعه یافته است. براساس آمار جهانی سرطان در سال ۲۰۱۸، در کشور ایران حدود ۱۱۰۰۰۰ بیماری سرطان بوجود آمده که از این میان منجر به فوت ۵۶۰۰۰ بیمار شده است (۱). چهار علت مهم در پیشرفت سرطان دخیل هستند: (۱) تکثیر نامنظم سلولی که به دلیل خودکفایی سیگنال‌های رشد و یا عدم حساسیت به سیگنال‌های بازدارنده رشد رخ می‌دهد. (۲) فرار از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی. (۳) رگ‌زایی پایدار. (۴) تهاجم بافتی و متاستاز. این نوع ویژگی‌ها نتیجه جهش‌های DNA هستند که می‌توانند ارثی یا اکتسابی (به عنوان مثال، قرار گرفتن در معرض مواد و ویروس‌ها، التهاب مزمن، استرس اکسیداتیو) باشند. این جهش‌ها در مولکول DNA، باعث ایجاد سیگنال‌های پیچیده، مسیرهای سیگنالینگ و تداخل بین آبشارهای سیگنالینگ می‌شوند که مسئول سرطان‌زایی، تکثیر سلول‌های سرطانی و مهاجرت سلولی هستند (۲).

پیشرفت‌های زیادی در زمینه درمان‌های ضد سرطانی رایج از جمله پروتودرمانی، شیمی درمانی و جراحی ایجاد شده است، اما هنوز هم برای درمان این بیماری کارایی لازم و کافی را ندارند. اخیراً، توجه پژوهشگران بر روی کشف و توسعه داروهای جدید مشتق شده از محصولات طبیعی جلب شده است. سم عقرب مخلوط پیچیده‌ای از نوکلئوتیدها، پپتیدها، پروتئین‌ها، نمک‌ها و املاح معدنی است که از لحاظ بیولوژیکی فعال بوده و مولکول‌های طبیعی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله دیابت، فشار خون، سرطان و ... محسوب می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند که سم عقرب سبب جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۱). از سموم عقرب‌ها و اجزای آن‌ها در درمان برخی سرطان‌ها از جمله سرطان شش، پروستات، ملانوما، سینه، مغز، لوکمیا، پوست، گردن، مری و کولون استفاده میشوند. مشخص شده است که برخی از پپتیدهای موجود در سموم، قادرند به طور اختصاصی به غشای سلول‌های سرطانی متصل شده و مهاجرت و تکثیر آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند. پپتیدهای مختل کننده غشاهای حرکت یون‌ها اثر گذاشته و در نهایت منجر به دیپلاریزاسیون، افزایش منافذ و تراوش محتوای سلولی می‌گردند (۳). با توجه به اهمیت بالای سم عقرب در درمان بیماری‌ها و همچنین توسعه دارویی، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیک دو فرکشن ۲ و ۴ استخراجی از سم عقرب *Hemiscorpius lepturus* بر روی سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 و بررسی بیان ژن‌های Bcl-2، Bax و Cytochrome c (Cyt c) بود.

۲- مواد و روش‌ها

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.

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

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 پیکها استفاده گردید. دو پیک شماره ۲ و ۴ جمع آوری و توسط فریز درایر خشک گردیدند (۴).

۲-۲- ارزیابی سمیت سلولی توسط سنجش MTT

ابتدا سلولهای سرطانی کبدی HepG2 از انستیتوپاستور تهران تهیه شدند و در محیط کشت RPMI164 با ۱۰ درصد آلبومین سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند. آنتی بیوتیکهای اضافه شده ۱۰۰ units/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین بودند. سپس سلولها در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷°C نگهداری شدند. سلولهای HepG2، در یک پلیت ۹۶ خانه ای با تراکم سلولی ۱۰^۴ cells/well × ۱ کشت داده شدند، غلظت های مختلف فرکشن های ۲ و ۴ (۵۰-۰ 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 اندازه گیری شد و درصد زنده مانگی سلولی محاسبه گردید (۴).

۳-۲- تهیه cDNA و انجام Real Time PCR

در ابتدا، سلول ها تحت تیمار ۲۴ ساعته با فرکشن های ۲ و ۴ قرار گرفتند. مایع رویی پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ خارج شد. سپس RNA کل توسط کیت شرکت کیاژن 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 اندازه گیری شد. جدول ۱ آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه را نشان می دهد (جدول ۱). جهت اندازه گیری بیان ژن، تکثیر ژن های مورد مطالعه با استفاده از Real Time PCR صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی توسط اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس با استفاده از دستگاه ABI 7300 صورت گرفت. داده های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شد و تجزیه و تحلیل گردید.

۳-۳- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل های آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism 9 انجام شد. تفاوت بین گروه ها 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

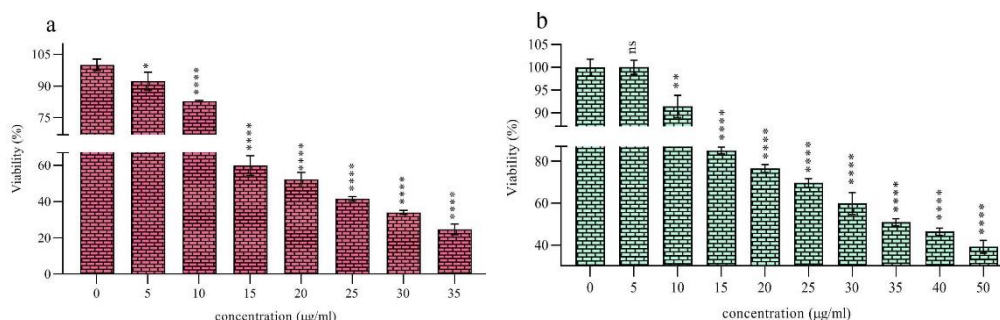
۵-۶ دی ماه ۱۴۰۳، دانشگاه هرمزگان

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: AAGGGAGGCAAGCACAAGACTG 3' 5' R: CTCCATCAGTGTATCCTCTCCC 3'

۳- نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت‌های دو فرکشن F2 و F4 استخراجی از سم عقرب از صفر به $50 \mu\text{g/ml}$ ، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 کاهش معناداری یافت ($p < 0.05$). درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی HepG2 تیمار شده با بالاترین غلظت فرکشن ۲ ($35 \mu\text{g/ml}$) و فرکشن ۴ ($50 \mu\text{g/ml}$)، به ترتیب، به میزان ۷۶/۴٪ و ۶۲/۴٪ کاهش نشان داد (شکل ۱)



شکل ۱. منحنی‌های دوز-پاسخ اثر غلظت‌های مختلف فرکشن ۲ (a) و فرکشن ۴ (b) بر روی سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 در زمان ۲۴ ساعت. ns، عدم اختلاف معنادار و همچنین * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) و *** ($p < 0.0001$) وجود اختلاف معنادار را میان درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف دو فرکشن نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار نشان می‌دهد.

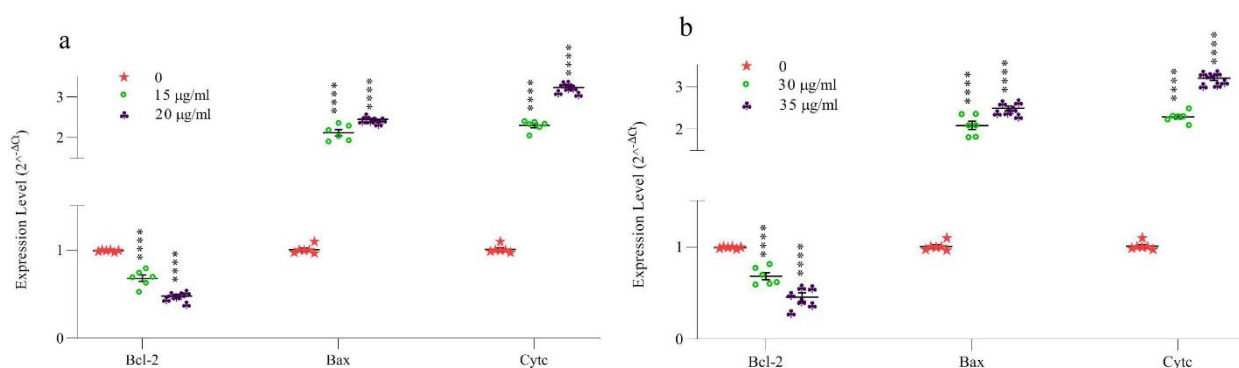
18th National and 3rd International Conference
of Iranian Biophysical chemistry

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

نتایج مربوط به بیان ژن نشان داد که با افزایش غلظت فرکشن ۲ و ۴، بیان ژنهای Bax و Cytc در سلولهای سرطانی کبدی HepG2 افزایش داشت، در حالیکه بیان ژن Bcl-2 سلولهای سرطانی HepG2 تیمار شده با دو فرکشن نسبت به سلولهای سرطانی بدون تیمار کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. میزان بیان ژن در سطح mRNA ژنهای Bcl-2, Bax و Cytc سلولهای سرطانی کبد HepG2 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 غلظت‌های ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۳۵ دو فرکشن ۲ و ۴ نسبت به سلولهای سرطانی بدون تیمار می‌باشد.

۴- بحث

رادیوتراپی و شیمی درمانی با وجود مقاومت چند دارویی و سمیت آنها نسبت به بافت طبیعی، جز رایج‌ترین روش‌های غیرجراحی در درمان سرطان هستند. با این حال، درمان‌های جدید با عوارض جانبی کمتر به فوریت مورد نیاز است. در این میان، سموم عقرب‌ها به دلیل هدف قرار دادن غشای سلولی، به عوامل ضدسرطانی امیدوارکننده تبدیل شده‌اند و احتمالاً کمتر مقاومت دارویی را در سلول‌های توموری القا کنند (۵). در مطالعه حاضر، سمیت سلولی دو فرکشن F2 و F4 استخراجی از سم عقرب در برابر سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 بررسی شده است. ما نشان دادیم که دو فرکشن خالص سازی‌شده به طور قابل توجهی تکثیر سلول‌های HepG2 را سرکوب کرد. مقادیر IC₅₀ دو فرکشن F2 و F4، به ترتیب، ۲۰/۴۱ μg/ml و ۳۷/۵۴ بدست آمد که بیانگر سمیت بیشتر فرکشن ۲ است. تحقیقات نشان داده است که پپتید ضد میکروبی کاتیونی Smp43 از سم عقرب *Scorpio maurus palmatus* استخراج شده است. نتایج نشان داد که IC₅₀ این پپتید در برابر سلول‌های سرطانی ریه A549 برابر با ۲/۵۸ μM بود (۶).

جهت بررسی مکانیسم مولکولی احتمالی ضد سرطانی دو فرکشن F2 و F4 در برابر رده سلولی HepG2، بیان ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز (Bcl-2, Bax و Cytc) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر، بیانگر افزایش معنادار بیان ژن‌های Bax و Cytc در سلول‌های سرطانی کبدی تیمار شده با هر دو فرکشن نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار بود، در

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

حالی که بیان ژن Bcl-2 کاهش نشان داد. بررسی‌های بیشتر در رابطه با پپتید Smp43 جداسازی شده از سم عقرب نشان داد که این پپتید، از طریق غشا و فرآیند اندوسیتوز وارد سلول‌های A549 شده و باعث به هم‌ریختگی اسکلت سلولی، از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری، آپوپتوز غیر طبیعی، توزیع چرخه سلولی و اتوفازی ناشی از میتوکندری می‌شود (۶). همچنین در مطالعه دیگر، خاصیت ضد سرطانی پپتید Smp24 خالص سازی شده از سم عقرب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پپتید Smp24 بدون اینکه اثر قابل توجهی بر روی سلول‌های نرمال داشته باشد، سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی رده HepG2 گردید. علاوه بر این نشان داد شد که اثر ضد توموری Smp24 ارتباط نزدیکی با القای آپوپتوز سلولی، توقف چرخه و اتوفازی از طریق اختلال غشای سلولی و اختلال عملکرد میتوکندری دارد (۷).

۵- نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فرکشن‌های F2 و F4، دارای خاصیت ضدسرطانی قوی دارند که از طریق القای فرآیندهای سلولی مربوط به اختلال غشای سلولی و عملکرد میتوکندری و در نهایت آپوپتوز اعمال می‌شود.

مراجع

- [1] Keshavarz h, Zargan J, Bidmeshkipour A, Heydari A, Kamran MR, Hajinoormohammadi A, Zamani E. Iranian scorpion (*Odontobuthus bidentatus*) venom induces apoptosis in the hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) in 3D cell culture, Mod Med Lab; 4(2): 28-32, 2021.
- [2] Rapôso C. Scorpion and spider venoms in cancer treatment: state of the art, challenges, and perspectives. J Clin Transl Res; 3(2): 233-249. 2017
- [3] Veiga ABG, Berger M, Guimarães JA. Lonomia oblique venom: Pharmacotoxicological effects and biotechnological perspectives. In: De Lima ME, Pimenta AMC, Martin- Eauclaire MF, Zingali RB, Rochat H. (Eds.), Animal Toxins: State of the Art: Perspectives in Health and Biotechnology. UFMG, BeloHorizonte, pp. 372-390, 2009.
- [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] Kunda NK. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. Drug Discov Today; 25(1): 238-247, 2020.
- [6] Deng Z, Gao Y, Nguyen T, Chai J, Wu J, Li J, Abdel-Rahman MA, Xu X, Chen X. The potent antitumor activity of Smp43 against non-Small-cell lung cancer A549 cells via inducing membranolytic and mitochondrial dysfunction. Toxins (Basel); 15(5): 347, 2023.
- [7] Nguyen T, Guo R, Chai J, Wu J, Liu J, Chen X, Abdel-Rahman MA, Xia H, Xu X. Smp24, a scorpion-venom peptide, exhibits potent antitumor effects against hepatoma HepG2 cells via multi-mechanisms *in vivo* and *in vitro*. Toxins (Basel); 14(10):717, 2022.

The effects of two fractions isolated from scorpion venom on inhibiting proliferation and inducing apoptosis in the HepG2 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

Scorpion venom inhibits and suppresses cancer cells through various mechanisms, including the induction of apoptosis. In this study, the in vitro activity of two fractions, F2 and F4, obtained from *Hemiscorpius lepturus* venom was investigated using the HPLC method. In the first step, the cytotoxicity of the two isolated fractions, F2 and F4, against the HepG2 cancer cell line was assessed using the MTT assay. Thus, the cells were treated with various concentrations of F2 and F4 (0-50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours. In the second step, cell death was evaluated through the real-time PCR technique to analyze the expression levels of genes involved in apoptosis. During the gene expression measurement phase, cancer cells were treated with each of two concentrations of F2 (15 $\mu\text{g/mL}$ and 20 $\mu\text{g/mL}$) and F4 (30 $\mu\text{g/mL}$ and 35 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours. The results showed that increasing the concentration of the purified fractions was associated with a significant decrease in cell viability ($p < 0.05$). Notably, F2 at a concentration of 20.41 $\mu\text{g/mL}$ and F4 at a concentration of 37.54 $\mu\text{g/mL}$ induced 50% cell death. Gene expression analysis indicated that increasing the concentration of both fractions was associated with a significant increase in the expression of Bax and cytochrome c genes, while the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($p < 0.05$). In general, it seems that the cytotoxic effect of the two fractions obtained from scorpion venom appears to be associated with their ability to induce apoptosis via the mitochondrial pathway. Consequently, *H. lepturus* scorpion venom may be a promising natural extract for further research in liver cancer treatment strategies.

Keywords: Scorpion venom, *Hemiscorpius lepturus*, Viability, Apoptosis, Gene expression