



Research article

Examining the anticancer properties of HL-7 peptide through changes in Fas, caspase 8 and caspase 3 gene expression

Zahra Setayesh Mehr

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Zabol University, Zabol, Iran
(Corresponding author). setayeshmehr@uoz.ac.ir

Hosein Kamaladini

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Zabol University, Zabol, Iran.
hu_kamaladini@yahoo.com

Mohammad Haji Tabar

Master's Degree, Department of Biology, Faculty of Science, Zabol University, Zabol, Iran.
mohhaji75@gmail.com

Abstract

Objective: Cervical cancer is an important cause of female mortality worldwide. The results obtained so far indicate the involvement of bioactive peptides in cancer treatment. In this regard, the aim of the present study is to investigate the anticancer properties of HL-7 peptide through changes in Fas, caspase 8 and caspase 3 gene expression.

Materials and methods: In this study, the viability of cervical cancer cells treated with HL-7 peptide at two concentrations of 45 and 60 μM at two times of 12 and 24 hours was investigated using MTT assay. Also, the expression of Fas, caspase 8 and caspase 3 genes was measured at mRNA and protein levels, respectively, using Real-Time PCR and Western Blot methods. Finally, the activity level of caspase 3 and caspase 8 was checked through ELISA test.

Findings: The results showed that the viability of cancer cells treated with HL-7 peptide decreased in a dose- and time-dependent manner ($p < 0.05$). By increasing the concentration of HL-7 peptide from 45 to 60 μM , significantly, the expression of Fas, caspase 8 and 3 genes increased in mRNA and protein levels ($p < 0.05$). The results of the ELISA test showed that the activity of caspase 8 and caspase 3 significantly increased in Hela cancer cells treated with HL-7 peptide compared to untreated cancer cells ($p < 0.05$).

Cite this article: Setayesh Mehr Z, Kamaladini H & Haji Tabar M. Examining the anticancer properties of HL-7 peptide through changes in Fas, caspase 8 and caspase 3 gene expression. *Applied Biology*. 2023; 13(1): 85-102.

Received: 2022/12/25 ; **Revised:** 2023/01/18 ; **Accepted:** 2023/01/31 ; **Published online:** 2023/02/19

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University



Conclusion: It seems that HL-7 peptide is able to eliminate cervical cancer cells by regulating the expression of genes involved in the extrinsic apoptosis signaling pathway. At the same time, more studies on molecular targets are suggested to confirm the anticancer properties of HL-7 peptide.

Keywords: Peptide, HL-7, HeLa, Apoptosis, Cancer, Fas gene expression, Caspase 8, Caspase 3, Cervix.



مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت ضدسرطانی پپتید HL-7 از طریق تغییر در بیان ژن Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳

زهرا ستایش مهر ^{ID} استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران (نویسنده مسئول). zetayeshmeh@uoz.ac.ir
 حسین کمال‌الدینی ^{ID} استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران. hu_kamaladiny@yahoo.com
 محمد حاجی تبار ^{ID} کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران. mohhajit5@gmail.com

چکیده

هدف: سرطان دهانه رحم، عامل مهمی در مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. نتایج به دست آمده تا به امروز، بیانگر دخالت پپتیدهای فعال زیستی در درمان سرطان است. در این راستا، هدف پژوهش حاضر بررسی خاصیت ضدسرطانی پپتید HL-7 از طریق تغییر در بیان ژن Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی دهانه رحم تیمار شده با پپتید HL-7 در دو غلظت ۴۵ و ۶۰ میکرومولار در دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت، با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. همچنین بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ در سطح mRNA و پروتئین، به ترتیب، با استفاده از روش‌های Real-Time PCR و وسترن بلات اندازه‌گیری گردید. در نهایت، میزان فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ از طریق آزمون الیزا بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-7 با روشی وابسته به دوز و زمان، کاهش یافت ($p < 0.05$). با افزایش غلظت پپتید HL-7 از ۴۵ به ۶۰ میکرومولار، به طور معناداری، بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ در سطوح mRNA و پروتئین افزایش یافت ($p < 0.05$). نتایج آزمون الیزا نشان داد که فعالیت کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳، به طور معناداری در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با پپتید HL-7 نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار، افزایش نشان داد ($p < 0.05$).

پژوهش حاضر برگرفته از: پایان‌نامه کارشناسی ارشد محمد حاجی تبار، استاد راهنما: زهرا ستایش مهر و استاد مشاور: حسین کمال‌الدینی است.

استاد به این مقاله: ستایش مهر ز، کمال‌الدینی ح، حاجی تبار م. بررسی خاصیت ضدسرطانی پپتید HL-7 از طریق تغییر در بیان ژن Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳. *بیولوژی کاربردی*. ۱۴۰۲؛ ۱۳(۱): ۸۵-۱۰۲.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۴؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

© نویسندگان



نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پپتید HL-7، از طریق تنظیم بیان ژن‌های درگیر در مسیر سیگنالینگ آپتوز بیرونی، قادر به حذف سلول‌های سرطانی دهانه رحم است. در عین حال، مطالعات بیشتری در زمینه اهداف مولکولی جهت تأیید خاصیت ضدسرطانی پپتید HL-7 پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: پپتید، HL-7، HeLa، آپتوز، سرطان، بیان ژن Fas، کاسپاز ۸، کاسپاز ۳، دهانه رحم.

۱. مقدمه

پیشینه وجود و تکامل عقرب‌ها، به ۴۰۰ میلیون سال پیش بازمی‌گردد. گونه‌های عقربی از لحاظ جغرافیایی در سراسر جهان توزیع شده‌اند (۱۴ و ۱۶). کسب توانایی دفاع عقرب‌ها در برابر شکارچیان و به دام‌اندازی طعمه، به دلیل تولید سمومی است که توسط غدد سمی تخصص یافته موجود در انتهای تلسون عقرب ترشح می‌شود (۱۷ و ۱۵). در طولانی مدت، تکاملی عقرب‌ها روی کره زمین، گروهی از پپتیدهای سمی ایجاد شده‌اند که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی متنوع هستند (۱).

پپتیدهای موجود در سم عقرب، به دو گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند که عبارتند از:

۱. پپتیدهای دارای پل دی‌سولفیدی^۱ که معمولاً کانال‌های یونی غشایی را مورد هدف قرار می‌دهند.

۲. پپتیدهای فاقد پل دی‌سولفیدی^۲ که به‌عنوان گروه کوچکی در مواد مترشحه شده غده سمی،

دارای فعالیت‌های چندعملکردی هستند (۳ و ۴).

پپتیدهای NADB، گروه منحصر به فردی از پپتیدهای موجود در سموم عقرب‌ها هستند که در دو دهه اخیر، از لحاظ عملکردی دسته‌بندی شده‌اند. یکی از مهم‌ترین دلایلی که سبب جلب توجه محققان نسبت به این نوع پپتیدها شده است، وجود عملکردهای بیولوژیکی متنوع آنهاست. از میان اعمال بیولوژیکی NDBPs، می‌توان به فعالیت‌های ضد میکروبی، ضدسرطانی، همولیتیکی، ضد انعقاد خون، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و تقویت‌کننده برادی‌کینین اشاره کرد. علاوه بر این، NDBPs ها تنوع ساختاری همچنین اهداف بیولوژیکی متنوعی دارند (۲۲).

پپتیدهای ضدسرطانی، گروه کوچکی از پپتیدها هستند که کمتر از ۵۰ باقیمانده آمینواسیدی دارند. مطالعات بیانگر استخراج و شناسایی دو پپتید ضدسرطانی مشتق شده از سم عقرب *Tityus serrulatus*، به نام‌های TsAP-1^۳ و TsAP-2^۴ هستند. نتایج مطالعات حاکی از آن است که TsAP-1، سبب مهار تکثیر دو رده سلول سرطانی H838 و H157 شده و مقادیر IC₅₀ آن، بر دو رده سلولی مذکور، به ترتیب، ۵۵ و ۵۲ میکرومولار به دست آمد. پپتید TsAP-2، فعالیت ضدسرطانی معناداری در برابر پنج رده سلول انسانی با IC₅₀ در مقادیر ۴/۱ میکرومولار رده سلولی

-
1. Disulfide-bridged peptides (DBPs)
 2. Non-disulfide-bridged peptides (NDBPs)
 3. *Tityus serrulatus* Anticancer Peptide-1
 4. *Tityus serrulatus* Anticancer Peptide-2

ریه (H157)، ۱۱ میکرومولار رده سلولی پروستات (H838)، ۱۵/۴ میکرومولار رده سلولی عصبی (U251-MG)، ۶/۴ میکرومولار رده سلولی سینه (MCF-7) و ۱۳/۳ میکرومولار رده سلولی پروستات (PC3) داشت. علاوه بر این، با بررسی فعالیت همولیتیکی این دو پپتید مشاهده شد که TsAP-2، هیچ فعالیت همولیتیکی معناداری تا غلظت ۱۵ میکرومولار نشان نداد (۷).

یکی از سازوکارهای مهم در درمان سرطان، بررسی آپتوز سلولی است. گزارشات بیانگر اثر ضدسرطانی پپتیدهای مشتق شده از سموم حیوانات از طریق هدف گذاری مسیر سیگنالینگ آپتوز و تنظیم پروتئین های آن است. برخی مطالعات به تنظیم مسیر آپتوز توسط ملیتین، پپتید استخراج شده از سم زنبور *Apis Mellifera* و عواملی پرداخته اند که سبب القاء مرگ سلولی در انواع مختلف سرطان مانند پستان، تخمدان، پروستات و ریه می شوند (۱۱، ۱۲، ۲۰ و ۲۳). در مطالعه ای نشان داده شد که ملیتین، به شدت درصد زنده ماننی را در دو رده سلول سرطانی لوسمی کاهش داد، بدون اینکه اثر سمیت معناداری بر سلول های تک هسته ای خون محیطی ۳۱ داشته باشد. در این رابطه، بررسی های بیشتر نشان داده است که ملیتین از طریق تغییر در پتانسیل غشاء میتوکندریایی و به دنبال آن، تنظیم فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ سبب آپتوز در سلول های لوسمی شد (۹). پپتید HL-7 یک پپتید ۷ آمینو اسیدی از توالی های YLYELAR با خاصیت بایواکتیویتی ۴۲ بالا و جزو پپتیدهای بدون پیوند دی سولفیدی است که از سم عقرب گونه *Hemiscorpius Lepturus* استخراج شده است. با توجه به اهمیت سموم عقرب در طب سنتی و داشتن فعالیت های بیولوژیکی متنوع برای پپتیدهای NDBPs، این مطالعه به منظور بررسی درصد زنده ماننی و بیان ژن های Fas، Caspase-3 و Caspase-8 در سلول های سرطانی دهانه رحم HeLa تیمار شده با پپتید HL-7 در سطح mRNA و پروتئین انجام شد. همچنین فعالیت Caspase-3 و Caspase-8 در سلول های سرطانی تیمار شده با روش الیزا بررسی گردید.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. جداسازی نوتروفیل ها

ابتدا، هم حجم با خون کامل، دکستران ۵ درصد اضافه شد. سپس در دمای ۳۷ درجه

1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

2. Bioactivity

سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از آن، مایع رویی غنی از گلبول‌های سفید خونی به آرامی به لوله دیگری حاوی ۳ میلی لیتر فایکول اضافه شد. در مرحله بعد، سانتیفریوژ به مدت ۲۵ دقیقه و با دور rpm ۳۵۰۰ انجام شد تا نوتروفیل‌ها به صورت رسوبات از مخلوط جدا شوند. سپس نوتروفیل‌ها با RPMI-1640 شستشو شدند. تمامی مراحل جداسازی در شرایط استریل انجام شد.

۲-۲. کشت سلول

در این مطالعه، سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد C115 تهیه شد. محیط کشت سلول‌ها، RPMI1640 شامل FBS ده درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین یک درصد، با شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO₂ بود. هر ۴۸ ساعت، یک‌بار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد تا زمانی که تراکم سلولی به ۷۰ درصد رسید.

۲-۳. سنجش زیست‌پذیری سلولی به روش MTT

به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیسیته پپتید HL-7 بر رده سلولی HeLa، از روش MTT استفاده شد. اساس این روش، تبدیل تترازولیم به فورمازان توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی است. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت اولیه سلول سرطانی در پلیت ۹۶ خانه (۱۰ × ۵ سلول به چاهک)، سلول‌های درون چاهک‌ها توسط غلظت‌های مختلف پپتید HL-7 (۰، ۴۵، ۶۰ و ۸۰ μg/ml) برای مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در نهایت، به هر چاهک، ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه شد و متعاقباً پلیت‌های حاوی سلول به مدت ۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت هر کدام از زمان‌های منتخب، میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر، توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. برای شفاف بودن مطالعه و نتایج، از نمایش تاثیر غلظت ۸۰ μg/ml در نمودار سلول سرطانی استفاده نشد. علاوه بر این، سلول‌های طبیعی نوتروفیل ۱۱ به عنوان شاهد در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده و سپس در غلظت‌های (۰، ۴۵، ۶۰ و ۸۰ μg/ml) کشت داده شده و برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. در نهایت، به هر چاهک، ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه شد و متعاقباً پلیت‌های حاوی سلول به مدت ۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت هر کدام از زمان‌های منتخب، میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰

نانومتر، توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. در انتها با محاسبات انجام شده در نرم‌افزار گراف‌پد پریسم ۲۱، میزان IC50 بدست آمد.

۲-۴. استخراج RNA و سنتز cDNA

به‌منظور سنجش بیان ژن، سلول‌های شاهد نوتروفیل و سرطانی دهانه رحم HeLa، با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا شده و بعد از شستشو با محیط کشت PBS 1X، به پلیت ۶ خانه منتقل شد تا برای تکمیل تست آماده شود. با غلظت ۴۵ و ۶۰ میکرومولار با دو تکرار از پپتید HL-7 انکوبه شدند. به دلیل وجود اختلاف معنادار در نتایج MTT، پس از گذشت ۲۴ ساعت، کل RNA سلول‌ها با استفاده از کیت جداسازی RNA (Denazist Co. Mashhad, Iran)، استخراج شدند. به دلیل غلظت مناسب از نمونه RNA، حدود ۲ میکرولیتر RNA کل با استفاده از کیت سنتز (Kiagene Fanaver, Tehran, Iran)، برای تبدیل به cDNA برداشت شد. حجم موردنظر برای انجام واکنش ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر RNA کل، ۱ میکرولیتر پرایمر الیگو dT، ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۳ میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، ۴ میکرولیتر بافر 5X و ۲ میکرولیتر آنزیم ReverAid RT بود که به‌ترتیب در دماهای ۷۰ درجه سانتیگراد (۵۰ دقیقه)، ۳۷ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه) و ۷۰ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه) انکوبه شد. در نهایت، cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

۲-۵. Real Time PCR

واکنش RT-PCR، در دستگاه Real Time PCR (مدل X960B) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرولیتر از SYBR Green PCR master mix، یک میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر از پرایمرها و ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی واکنش، ۹۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ ثانیه تنظیم شد. ژن GAPDH، به‌عنوان کنترل داخلی و برای تحلیل نتایج، از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. توالی پرایمرها برای آنالیز Real time PCR در جدول شماره (۱) آمده است.

۲-۶. آنالیز وسترن بلات

ابتدا به تعداد $10^7 \times 1$ سلول سرطانی Hela کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، تیمار پپتیدی با دو غلظت ۴۵ و ۶۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در مرحله بعد، جمع‌آوری سلول‌ها از طریق اسکرابر انجام شده و سانتریفیوژ با دور rpm ۱۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه انجام شد. سلول‌ها دو بار توسط PBS 1X شستشو شدند. به تعداد $10^6 \times 5$ سلول، ۱ درصد مهارکننده پروتئاز و ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده RIPA (Abcam, Cambridge, UK) اضافه شد. لیز شدن کامل سلول‌ها در بافر لیزکننده به مدت ۲۰ دقیقه ادامه پیدا کرد. جهت جمع‌آوری لیزات سلولی، سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. غلظت پروتئین در عصاره سلولی با استفاده از کیت BCA (Arman Biotech) مشخص شد. جهت آنالیز وسترن بلات، ۵۰ میکروگرم از نمونه پروتئینی استفاده شد و برای انجام الکتروفورز، روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد سوار شد. پس از انجام الکتروفورز، پروتئین‌ها به غشاء نیتروسولوزی انتقال یافتند. جهت پوشاندن نواحی غیراختصاصی، غشاء نیتروسولوزی به مدت یک شبانه‌روز، در شیر خشک بدون چربی با بافر PBS همراه با ۰/۰۵ درصد Tween 20 (PBS-T) قرار گرفت. در نهایت کاغذ نیتروسولوزی با آنتی بادی اولیه و ثانویه خاص پروتئین‌های Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ انکوبه شدند. در نهایت پس از خشک شدن غشاء و تصویربرداری از آن، برای اندازه‌گیری شدت و ضخامت باندهای پروتئینی از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

۲-۷. اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳

به منظور اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ از کیت رنگ‌سنجی Abcam استفاده شد (Abcam, Cambridge, UK). پس از کشت به تعداد $10^6 \times 5$ ، سلول‌ها با غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار از پپتید HL-7 به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. نمونه کنترل با غلظت صفر و یا بدون تیمار در نظر گرفته شد. سپس سلول‌ها در ۵۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی سرد سوسپانسی و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ، انکوبه شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و به یک میکروتیوپ جدید منتقل شد. غلظت پروتئین استفاده شده به ازای هر چاهک، ۵ تا ۲۰۰ میکروگرم پروتئین ۵۰ میکرولیتر بافر بود. میزان ۱۰ میکرولیتر DTT یک مولار به ۱ میلی لیتر بافر واکنش ۲X اضافه شد (غلظت نهایی ۱۰۰ نانومتر). از مخلوط DTT/بافر واکنش ۲X، به میزان ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر سوبسترای

۴ IED.pNA مولار به هر چاهک اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ در نمونه‌های تیمار شده با مقایسه نمونه‌های بدون تیمار اندازه‌گیری شد.

۲-۸. آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-19 و استفاده از آزمون ANOVA و LSD در سطح معناداری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

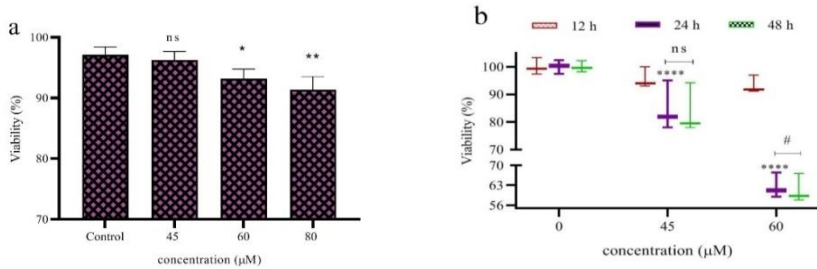
۳. یافته‌ها

۳-۱. درصد زیست‌پذیری سلولی

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Genes	Primer sequences: 5' → 3'	length	n/mol
GAPDH	Forward: AGCCAAAAGGGTCATCATC	19	23.52
	Reverse: TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG	20	23.11
Fas	Forward: GGACCCAGAATACCAAGTGCAG	22	24.81
	Reverse: GTTGCTGGTGAGTGTGCATTCC	22	25.42
Caspase 8	Forward: ATTCAGCAAAGGGGAGGAGT	20	23.10
	Reverse: TTCAAAGGTCGTGGTCAAAG	20	23.36
Caspase 3	Forward: GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	23	28.95
	Reverse: GCATCGACATCTGTACCAGACC	22	25.53

نتایج سنجش MTT نشان داد که ارتباط معکوسی میان درصد زنده‌مانی سلول‌های زنده سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های مختلف پپتید HL-7 و سلول‌های بدون تیمار وجود داشت؛ به طوری که با افزایش غلظت پپتید HL-7، درصد سلول‌های زنده تیمار شده، کاهش نشان داد ($p < 0.05$). با وجود عدم تفاوت معنادار میان درصد سلول‌های زنده تیمار شده با غلظت ۴۵ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت نسبت به زمان ۱۲ ساعت از پپتید HL-7 نسبت به سلول‌های بدون تیمار، تفاوت معنادار فاحشی برای غلظت ۶۰ میکرومولار در زمان ۲۴ نسبت به ۱۲ ساعت به دست آمد ($p < 0.0001$) (نمودار ۱). طبق محاسبات انجام شده در نرم‌افزار گراف‌پد پریسم، مقدار IC_{50} برای پپتید HL-7، در غلظت ۶۰ میکرومولار بدست آمد. تغییرات چندانی در رابطه با سلول‌های طبیعی نوتروفیل تیمار شده با پپتید HL-7 در غلظت ۶۰ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت مشاهده نشد ($p < 0.05$). مقدار IC_{50} برای پپتید HL-7، ۶۰ میکرومولار به دست آمد.

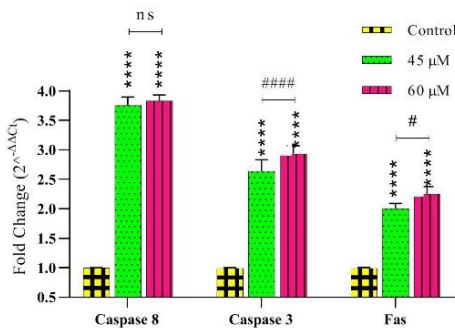


نمودار ۱- اثر سمیت پپتید HL-7 بر سلول‌های طبیعی نوتروفیل (a) و سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa (b).

*** بیانگر اختلاف معنادار در غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار در زمان ۲۴ ساعت نسبت به همان غلظت‌ها در زمان ۱۲ ساعت است (p<0.0001). ns, بیانگر عدم اختلاف معنادار (p<0.0001) و # بیانگر وجود اختلاف معنادار (p<0.01) میان غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار در زمان ۴۸ ساعت نسبت به همان غلظت‌ها در زمان ۲۴ ساعت است.

۲-۳. Real time PCR

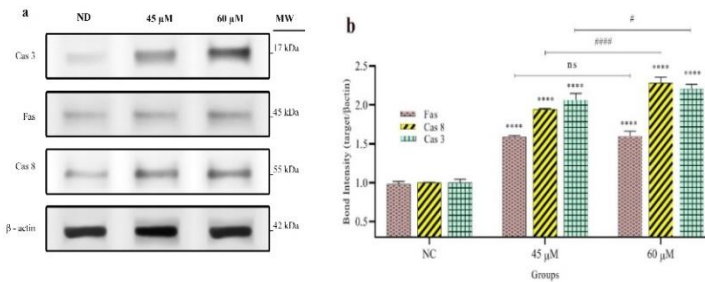
نمودار (۲)، بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳، همچنین Fas در سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa تیمار شده با غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار پپتید HL-7 را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پپتید HL-7، اثر معناداری بر بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ داشت؛ بدین صورت که پپتید HL-7، سبب افزایش معنادار بیان ژن‌های Fas، Caspase-3 و Caspase-8 در سلول‌های سرطانی تیمار شده نسبت به سلول‌های بدون تیمار شد (p<0.05) (نمودار ۲).



نمودار ۲- بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و ۳ در سطح mRNA در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با پپتید HL-7.

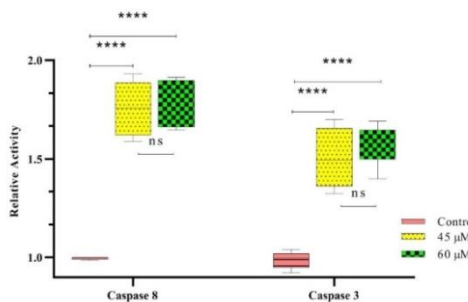
*** بیانگر اختلاف معنادار بیان ژن در سطح mRNA سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید نسبت به نمونه بدون تیمار است (p<0.0001). # و **** بیانگر اختلاف معنادار بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و ۳ در سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید در غلظت ۶۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۴۵ میکرومولار است (p<0.05).

نتایج وسترن بلات در این مطالعه، بیانگر تغییرات و تنظیم بیان پروتئین‌های مسیر آپتوز در سلول‌های سرطانی تیمار شده با HL-7 نسبت به سلول‌های سرطانی HeLa تیمار نشده (NC) بود، به طوری که این تغییرات برای پروتئین‌های Fas، کاسپاز ۸ و ۳ و Fas افزایشی بود ($p < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳- نتایج وسترن بلات. (a) بررسی بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و ۳ در سطح پروتئین. (b) نتایج کمی آنالیز وسترن بلات. ****#، بیانگر اختلاف معنادار بیان ژن در سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید نسبت به نمونه کنترل است ($p < 0.0001$). ns، بیانگر عدم اختلاف معنادار و # و ##### بیانگر اختلاف معنادار بیان ژن‌های Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-7 در غلظت ۶۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۴۵ میکرومولار است ($p < 0.05$).

نتایج به دست آمده از تست الایزا نشان داد که فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با پپتید HL-7 تغییر کرد (نمودار ۴). نتایج بیانگر افزایش معناداری در فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با پپتید HL-7 نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل) بود ($p < 0.05$) (نمودار ۴).



نمودار ۴- میزان فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار از پپتید HL-7 و سلول‌های سرطانی بدون تیمار.

****#، بیانگر وجود اختلاف معنادار در سطح $+/0001$ میان فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میکرومولار از پپتید HL-7 نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار بود. ns، بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار میان فعالیت کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت ۶۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۴۵ میکرومولار از پپتید HL-7 است ($p < 0.05$).

۴. نتیجه گیری

انتظار می‌رود که پپتید HL-7، وارد سلول شده و با برهمکنش با اهداف مولکولی درون سلولی، سمیت شدیدی را در تمامی سلول‌های تحت درمان خود نشان دهد. نتیجه حاصل از آنالیز MTT، تأییدکننده کاهش درصد زنده‌مانی و افزایش سمیت در سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-7 نسبت به سلول‌های بدون تیمار بود. کاهش معنادار درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید، از یک روند وابسته به غلظت و زمان تبعیت کرد. در مطالعات MTT، از سلول‌های طبیعی نوتروفیل، به‌عنوان کنترل سالم استفاده شد. نتایج نشان داد که پپتید HL-7، بدون ایجاد تغییرات معنادار در درصد زنده‌مانی سلول‌های طبیعی، قادر بود که زنده‌مانی سلول‌های سرطانی دهانه رحم را به‌طور معناداری کاهش دهد ($p < 0.05$). این نتایج با گزارشات Tu و همکاران مطابقت دارد. آنها دریافتند که پپتید ملیتین سبب ایجاد آپتوز در سلول‌های سرطانی A2058 شد؛ بدون اینکه اثر معناداری بر درصد زنده‌مانی سلول‌های طبیعی Detroit551 داشته باشد (۲۱).

در مطالعه حاضر، آنالیز حاصل از نتایج بیان ژن در سطح mRNA نشان داد که دو غلظت ۴۵ و ۶۰ میکرومولار از پپتید HL-7، سبب افزایش معنادار بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی دهانه رحم تیمار شده، نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار شد ($p < 0.05$). عناصر اصلی سازوکار مولکولی فرایند آپتوز، کاسپازها هستند. این قبیل آنزیم‌ها، جزء گروه اصلی پروتئازها می‌باشند که پروتئین‌ها را در موقعیت‌هایی که باقیمانده‌های اسیدآسپارتیک دارند، هیدرولیز می‌کنند. به‌نظر می‌رسد که فعال شدن کاسپازها، سبب القاء غیرقابل بازگشت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود. کاسپازها براساس نقش فیزیولوژیکی، به سه دسته آغازگرها (کاسپازهای ۲، ۸، ۹ و ۱۰)، عوامل آپتوز (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) و التهابی (۱، ۴ و ۵) تقسیم می‌شوند (۵ و ۱۶).

همچنین، برای بررسی سازوکار آپتوز، در مطالعه حاضر، علاوه بر بیان کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳، بیان پروتئین Fas نیز بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی دهانه رحم تیمار شده با پپتید HL-7، سبب افزایش معنادار بیان Fas، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار شد ($p < 0.05$). مطالعات نشان داده است که سم زنبور عسل به‌دلیل دارا بودن پپتیدهای فعال زیستی، قادر به القای آپتوز به روشی وابسته به دوز در دو رده سلول سرطانی ریه A549 و NCI-H460 شد. همزمان با مرگ سلولی، بیان ریسپتورهای مرگ (DR3 و DR6)، به‌طور

قابل توجهی افزایش یافت. همچنین بیان پروتئین‌های پروآپتوزی (کاسپاز ۳ و Bax) به‌طور همزمان افزایش یافت، اما فعالیت NF- κ B و بیان Bcl-2 مهار شد. نتایج حاصل نشان داد که سم زنبور عسل، از طریق افزایش بیان DR3 و مهار مسیر NF- κ B، سبب القاء آپتوز در سلول‌های سرطانی ریه شد (۲). در مطالعه‌ای دیگر، Zheng و همکاران، اثرات ضدسرطانی زهر زنبور عسل را بر رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ ارزیابی کردند. آنها گزارش دادند که زهر زنبور عسل، می‌تواند سبب القاء آپتوز در سلول‌های سرطانی روده بزرگ شود. علاوه بر این، ترکیبات موجود در زهر زنبور، قادر بودند بیان رسپتورهای مرگ (DRs)، p53، Bax و کاسپازها را افزایش دهند (۲۴). مطالعات نشان داده است، هنگامی که رسپتور مرگ به لیگاند خود متصل می‌شود، سبب جذب دمین مرگ پروتئین مرتبط با Fas (FADD: Fas-associated with Death Domain) و به دنبال آن، فعال شدن کاسپازهای ۸، ۹، ۳، همچنین افزایش پروتئین Bax و کاهش Bcl-2 و در نهایت القاء آپتوز می‌شود (۸، ۱۰ و ۲۵). این گزارشات با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، احتمال درگیر بودن پپتید HL-7 را در مسیرهای سیگنالینگ آپتوز بیرونی در رده سلولی سرطانی HeLa نشان می‌دهد.

مطالعات نشان داده است که ملیتین سبب القاء رسپتورهای مرگ شده و مسیر JAK2/STAT3 را در سلول‌های سرطانی تخمدان مهار می‌کند. کونگ و همکاران (۲۰ و ۱۶)، اثرات آپتوزی ملیتین را بر رده سلولی سرطانی SGC-7901 بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که بیان پروتئین‌های EndoG، Cyt c، Caspase 3 و AIF در سلول‌های SGC-7901، به‌طور معناداری بیشتر از نمونه‌های کنترل بود؛ در حالی که در معرض قرارگیری سلول‌ها با ملیتین، اثری بر بیان کاسپاز ۸ و Fas در سلول‌های SGC-7901 نداشت؛ بنابراین، می‌توان گفت که پپتید ملیتین، آپتوز را در سلول‌های سرطانی معده انسانی از طریق مسیرهای درونی وابسته به میتوکندری القاء می‌کند؛ در صورتی که مسیر سیگنالینگ Fas/FasL در آپتوز القاء شده توسط ملیتین نقشی ندارد (۱۳). نتایج به‌دست آمده از این مطالعات با مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

اگرچه پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در درمان سرطان دهانه رحم حاصل شده است، اما هنوز هم مقاومت در برابر مرگ سلولی مشاهده می‌شود. نتایج به‌دست آمده از سنجش MTT مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پپتید HL-7 با روش وابسته به دوز و غلظت، سبب افزایش سمیت و کاهش زنده‌مانی سلولی شد. اثرات مهارکنندگی رشد مشابهی از پپتید HL-7 در سلول‌های سرطانی MCF-7 و A549 مشاهده شده است، بدون اینکه اثر ضد تکثیری معناداری بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

انسانی (PBMCs) داشته باشد (۱۸،۱۹). در مطالعه حاضر نشان داده شد که سازوکار مرگ سلولی ناشی از پپتید HL-7، با فعال شدن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ همراه بود. بنابراین، یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه، بیانگر اثر پپتید HL-7 بر القاء عدم رشد سلول‌های سرطانی HeLa بود که می‌توان آن را نتیجه راه‌اندازی مسیر سیگنالینگ وابسته به Fas دانست.

References

1. Chippaux JP & Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica*. 2008; 107(2): 71-9.
2. Choi KE, Hwang CJ, Gu SM, Park MH, Kim JH, Park JH & et al. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins*. 2014; 6(8): 2210-28.
3. de la Vega RC & Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon*. 2005; 46(8): 831-44.
4. Dias NB, de Souza BM, Cocchi FK, Chalkidis HM, Dorce VA & Palma MS. Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus*. *Journal of proteomics*. 2018; 170: 70-9.
5. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007; 35(4): 495-516.
6. Erdeş E, Doğan TS, Coşar İ, Danişman T, Kunt KB, Şeker T & et al. Characterization of *Leiurus abduhbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2014; 20: 1-8.
7. 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.
8. Han Z, Pantazis P, Wyche JH, Kouttab N, Kidd VJ & Hendrickson EA. A Fas-associated death domain protein-dependent mechanism mediates the apoptotic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human leukemic Jurkat cell line. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(42): 38748-54.
9. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*. 2022; 12(1): 31-46.
10. Huang Y, He Q, Hillman MJ, Rong R & Sheikh MS. Sulindac sulfide-induced apoptosis involves death receptor 5 and the caspase 8-dependent pathway in human colon and prostate cancer cells. *Cancer research*. 2001; 61(18): 6918-24.
11. Ip SW, Chu YL, Yu CS, Chen PY, Ho HC, Yang JS & et al. Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca²⁺-modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells. *International Journal of Urology*. 2012; 19(1): 61-70.
12. Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB & et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012; 258(1): 72-81.
13. Kong GM, Tao WH, Diao YL, Fang PH, Wang JJ, Bo P & et al. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. *World journal of gastroenterology*. 2016; 22(11): 3186.
14. Lourenço WR. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida:

- Scorpiones). *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2018; 24.
15. Nabi G, Ahmad N, Ullah S & Khan S. Therapeutic applications of scorpion venom in cancer: Mini review. *Journal of Biology and Life Sciences*. 2015; 6(1): 57.
 16. Pfeffer CM & Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(2): 448.
 17. Santibáñez-López CE, Francke OF & Prendini L. Shining a light into the world's deepest caves: phylogenetic systematics of the troglolobitic scorpion genus *Alacran francke*, 1982 (Typhlochactidae: Alacraninae). *Invertebrate Systematics*. 2014; 28(6): 643-64.
 18. Setayesh-Mehr Z & Asoodeh A. Biochemical characterization of HL-7 and HL-10 peptides identified from scorpion venom of *Hemiscorpius lepturus*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2018; 24: 421-30.
 19. Setayesh-Mehr Z, Asoodeh A & Poorsargol M. Upregulation of Bax, TNF- α and down-regulation of Bcl-2 in liver cancer cells treated with HL-7 and HL-10 peptides. *Biologia*. 2021; 76(9): 2735-43.
 20. Shin JM, Jeong YJ, Cho HJ, Park KK, Chung IK, Lee IK & et al. Melittin suppresses HIF-1 α /VEGF expression through inhibition of ERK and mTOR/p70S6K pathway in human cervical carcinoma cells. *PloS one*. 2013; 8(7): e69380.
 21. Tu WC, Wu CC, Hsieh HL, Chen CY & Hsu SL. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*. 2008; 52(2): 318-329.
 22. Zeng XC, Corzo G & Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*. 2005; 57(1): 13-21.
 23. Zhang H, Zhao B, Huang C, Meng XM, Bian EB & Li J. Melittin restores PTEN expression by down-regulating HDAC2 in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *PloS one*. 2014; 9(5): e95520.
 24. Zheng J, Lee HL, Ham YW, Song HS, Song MJ & Hong JT. Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. *Oncotarget*. 2015; 6(42): 44437.
 25. Zhu H, Hu B, Ling W, Su Y, Qiu S, Xiao W & et al. Adenovirus E1A reverses the resistance of normal primary human lung fibroblast cells to TRAIL through DR5 upregulation and caspase 8-dependent pathway. *Cancer biology & therapy*. 2006; 5(2): 180-8.