Journal of Animal Biology, Winter 2025; 17(2):127-140

ISSN: 1735-9724

Research Article

Examining the *in vitro* and *in vivo* Effects of the HL-10 Peptide on the Immune System Modulation and Anticancer Activities of Hela Cancer Cells

Maryam Rezavand, Zahra Setayesh-Mehr*, Fatemeh Hadadi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran
*Corresponding author: setayeshmehr@uoz.ac.ir

Received: 17 MAy 2024 Accepted: 29 August 2024

DOI:

Abstract

The present study aimed to assess the anti-cancer properties, immune system regulation, and apoptosis signaling pathway impact of the HL-10 peptide through gene expression analysis of Bcl-2, Cytochrome c, and Bim. HeLa cervical cancer cells were subjected to treatment with HL-10 peptide for both 24 and 48 hours at varying concentrations. To assess the in vivo impacts of the HL-10 peptide, BALB-c mice were infected with cervical cancer. Serum levels of IFN-β and IL-4 were subsequently quantified via ELISA. Using real-time PCR, the expression of the genes Bim, Cytochrome c, and Bcl-2 in cells and tumors treated with the HL-10 peptide was analyzed, along with the percentage of viable cells and toxicity. The HL-10 peptide decreases the survival rate of HeLa cells in a way that is dependent on both the concentration and duration of exposure. The HL-10 peptide exhibited an IC50 value of 18.49 μM after 24 hours and 30.62 μM after 48 hours. The findings demonstrated that the HL-10 peptide exerted a significant impact on the expression of the investigated genes. The HL-10 peptide upregulated the expression of the BIM and Cytochrome c genes while downregulating the expression of the Bcl-2 gene in cancer cells treated with the HL-10 peptide, both *in vitro* and *in vivo*. The results indicated a significant decrease in the quantity of inflammatory components INF-γ, IL-1β, and IL-6 in the serum of untreated cancer mice (Sham) compared to untreated healthy mice (NC). Conversely, there was a significant rise in the concentration of IL-4 ($p < 0.05$). The HL-10 peptide likely functions in the modulation of the immune system and in the intrinsic pathways of apoptosis. The HL-7 peptide appears to be a viable and auspicious candidate in the realm of cervical cancer treatment.

Keywords: Peptide, Cancer, Apoptosis, Inflammatory factor, Immune system.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۴۰-۱۲۷

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲۴

مقاله پژوهشی

بررسی خاصیت ضدسرطانی و تنظیم کنندگی سیستم ایمنی سلول‌های سرطانی Hela تیمار شده با پپتید HL-10 در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی

مریم رضاوند، زهرا ستایش مهر*، فاطمه حدادی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

*مسئول مکاتبات: setayeshmehr@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۸

DOI:

چکیده

در این مطالعه خاصیت ضدسرطانی، تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی و همچنین اثر پپتید HL-10 بر مسیر سیگنال‌دهی آپوپتوز با اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bcl-2، Cytochrome c و Bim بررسی شد. سلول‌های سرطان دهانه رحم HeLa با پپتید HL-10 در غلظت‌های مختلف و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. به منظور ارزیابی اثرات درون‌تنی پپتید HL-10، سرطان دهانه رحم در موش balb-c القا شد. سپس، سطوح IFN-γ و IL-4 سرم، با استفاده از ELISA اندازه‌گیری شد. سمیت و درصد بقای سلولی، بیان ژن‌های Bim، Cytochrome c و Bcl-2 سلول‌ها و تومور تیمار شده با پپتید HL-10 به روش Real Time PCR بررسی شد. پپتید HL-10 زنده‌مانی سلول‌های HeLa را به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش می‌دهد. مقدار IC50 برای پپتید HL-10 در زمان ۲۴ ساعت، ۱۸/۴۹ میکرومولار و در زمان ۴۸ ساعت، ۳۰/۶۲ میکرومولار بدست آمد. نتایج نشان داد که پپتید HL-10 تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه داشت. پپتید Hl-10 باعث افزایش در بیان ژن *BIM* و Cytochrome c و کاهش بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های سرطانی درمان شده با پپتید HL-10 در مقایسه با سلول‌های درمان نشده در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی شد. همچنین، نتایج نشان داد که غلظت فاکتورهای التهابی INF- γ، IL-1β و IL-6 در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معنادار، درحالیکه غلظت IL-4 افزایش نشان داد ($p < ۰/۰۵$). احتمالاً پپتید HL-10 در مسیرهای ذاتی آپوپتوز و همچنین در تنظیم سیستم ایمنی نقش دارد. به نظر می‌رسد پپتید HL-7 می‌تواند یک کاندید مناسب و امیدوارکننده برای درمان سرطان دهانه رحم باشد.

کلمات کلیدی: پپتید، سرطان، آپپتوز، فاکتور التهابی، سیستم ایمنی.

مقدمه

عقرب‌ها، گروهی سازش‌یافته از حیوانات سمی هستند که از ۱۵۰۰ میلیون سال در کره زمین زندگی می کرده اند. عامل اصلی بقای انها، تولید سموم قوی است که برای کشتن یا فلج کردن طعمه و شکارچیان مورد استفاده قرار می‌دهند (۱۰). سموم عقرب‌ها از دیرباز است که در پزشکی سنتی کاربرد دارد. تحقیقات نشان داده است که قسمت‌های مختلف بدن عقرب یا سموم آنها، جهت درمان بسیاری از بیماری-ها از قبیل سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). سموم عقرب‌ها دارای ترکیبات مختلفی از جمله، پپتیدها، یون‌ها، مواد معدنی و آنزیم‌ها می‌باشند (۳۵). پپتیدهای فعال زیستی موجود در سموم عقرب‌ها را به

دو دسته کلی پپتیدهای دارای پل دی‌سولفیدی (DBPs) و پپتیدهای فاقد پل دی‌سولفیدی (NDBPs) تقسیم می‌کنند (۳٤). نوروتوکسین‌ها که جز پپتیدهای دارای پل دی سولفیدی می‌باشند، قادرند تا عملکرد انواع کانال‌های یونی هدف در سلول‌ها را اصلاح یا مسدود سازند. بنابراین، برخی از نوروتوکسین‌ها، به عنوان هدف درمانی برای توسعه دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند که دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدمالاریایی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و ضدسرطانی می‌باشند (۲۳). پپتیدهای بدون پل دی سولفیدی جز مهمی از سموم عقرب‌ها می‌باشند، در عین حال درصد کمی از پپتیدها را شامل می‌شوند. از این رو، توجه محققین، معمولا به سمت پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تغییر یافت. با توجه به کشف فعالیت بیولوژیکی متنوع، NDBPs را می‌توان به عنوان کاندیدای دارویی امیدبخش در آینده مورد بررسی بیشتر قرار داد (۳٤). در دهه های اخیر، پیشرفت قابل توجهی در تشخیص و روش درمان بیماری سرطان وجود داشته است. با این حال، عدم انتخاب پذیری مناسب برای سلول‌های توموری و بنابراین هدفگیری غیراختصاصی سلول‌های سالم با اثرات جانبی زیان بار، به طور جدی اثر داروهای شیمی درمانی موجود در بازار را محدود میکند (۹و۲٤). پپتیدهای ضدسرطانی، ترکیبات مهمی برای طراحی داروهای هدفگیری توموری و متعاقبا جلوگیری از توسعه و پیشرفت سرطان می‌باشند (۱٤، ۱٦). مطالعات نشان داده اند که پپتیدهای استخراجی از سم عقرب بواسطه توقف چرخه سلولی، تنظیم کانال-های یونی، مهار تکثیر و رگ زایی و همچنین القای آپوپتوز به درمان سرطان کمک می‌کنند (۱۵). به عنوان مثال، پپتیدی به نام بنگالین (Bengalin) استخراجی از سم عقرب سیاه هندی (*Heterometrus bengalensis*) سبب مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی از جمله لوسمی انسانی (U937) گردید، در صورتی‌که هیچ اثر سمیت معناداری بر سلول‌های لنفوسیت های طبیعی انسان نداشت. مشاهدات بیشتر نشان داد که پپتید بنگالین خواص ضدسرطانی خود را از طریق افزایش بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ ، افزایش بیان نسبت Bax به Bcl-2 و افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری اعمال کرد (٦). بررسی اثر سم عقرب *Buthus martensii* Karsch بر سلول‌های گلیوما در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی نشان داده که سم جدا شده منجر به القای آپوپتوز در رده سلولی گلیومای U251-MG در شرایط برون‌تنی شد، همچنین رشد سلول‌های تومور گلیوما را در درون بدن سرکوب کرد (۲۱). در شرایط طبیعی، سیستم ایمنی بدن سبب شناسایی و از بین بردن سلول‌های سرطانی در ابتدای شکل‌گیری می‌شود. بنابراین، بررسی وضعیت سیستم ایمنی و عوامل موثر بر آن در محیط شیمیایی سلول‌های توموری نقش بسیار مهمی در تشخیص، پیشرفت و درمان سرطان دارد. در این راستا، مطالعات نشان داده اند که سایتوکاین‌ها با تنظیم پاسخ ایمنی قادر به ایجاد یا مهار بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان هستند (۱۵). پاسخ ایمنی، یکی از حیاتی‌ترین پاسخ‌های بدن هنگام مواجهه با انواع تومورها است که این قبیل واکنش‌های طبیعی، شامل ترشح سایتوکاین‌هایی مانند اینترفرون گاما (INF-γ) و اینترلوکین ٤ (IL-4) می‌باشد (۲۲). افزایش بیان IL-4 در افزایش تکثیر و رشد سلول‌های توموری و همچنین متاستاز آنها در بدن نقش دارد. از طرفی دیگر، سایتوکاین دیگری به نام INF-γ، یک عامل متوقف‌کننده رشد سلول‌های توموری، تقویت فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی است (۲). در انواع سرطان‌ها بیان ژن‌های مرتبط با کانال-های یونی کنترل می‌گردد. تنظیم بیان کانال‌های یونی منجر به تغییر مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی و متعاقباً تنظیم فعالیت سلول‌های ایمنی می‌شود (۱۵).

سم عقرب *Tityus serrulatus* فعالیت تنظیم‌کنندگی ایمنی ماکروفاژها را بر عهده دارد. تزریق سم عقرب به موش سبب افزایش بیان فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α) و اینترلوکین‌ها (IL-1β، IL-6، IL-8 و IL-10) در ماکروفاژها می‌شود (۲۰). همچنین برخی از پپتیدهای فاقد پیوند دی‌سولفیدی مانند پارابوتوپورین (Parabutoporin) و اپیستوپورین (Opistopurin)، علاوه بر خواص ضد قارچی و ضدباکتریایی دارای فعالیت تنظیم‌کننده سیستم ایمنی نیز هستند. این پپتیدها قادر به فعال کردن اگزوسیتوز یا مهار تولید سوپراکسید در گرانولوسیت‌ها هستند (۳۱). بنابراین، سم عقرب و اجزای آن، تأثیر بسزایی در تنظیم سیستم ایمنی دارند و تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند سم عقرب را به عنوان یک عامل مهم در درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی و سرطان معرفی کند (۱۸). به دلیل وجود پپتیدهای فعال زیستی در سم عقرب، کشف فعالیت بیولوژیکی پپتیدها به ویژه در درمان سرطان و متعاقبا معرفی آن‌ها به عنوان عوامل امیدوارکننده در ساخت داروها، مطالعات اخیر به سمت بررسی بیشتر این نوع ترکیبات پیش رفته است. در مطالعات قبلی‌مان، خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 بر رده‌های سلول سرطانی A549، MCF-7 و HepG2 بررسی شد (۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر، اثر پپتید HL-10 بر رده سلول سرطانی دهانه رحم HeLa در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت و نگهداری سلول: پس از خریداری سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS ده درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتوزوسین یک درصد کشت داده شدند. فلاسک‌های حاوی سلول در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. پاساژهای سلول‌ها در دوره‌های زمانی ۴۸ ساعت و متعاقبا جایگزین محیط کشت سلولی تازه انجام گردید، تا زمانیکه تراکم سلول‌ها به ۷۰ درصد رسید.

اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول: برای بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از روش MTT استفاده شد. ابتدا سلول‌ها جهت چسبیدن به کف فلاسک محیط کشت و ایجاد شرایط پایدار، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس میزان ۵×۱۰^{۶} سلول شمارش و به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ میکرومولار پپتید HL-10 در زمان-های مختلف ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. پس از اضافه شدن محلول MTT (۱۰ میکرولیتر)، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند و پس از اضافه شدن DMSO (۱۵۰ میکرولیتر) به هر چاهک، میزان جذب پلیت‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر اندازه‌گیری شد:

$$\text{Cell viability (\%)} = [A]\ \text{sample} / [A]\ \text{control} \times 100$$

در این رابطه؛ [A] sample میزان جذب نمونه و [A] control میزان جذب کنترل است.

حیوانات: تمامی آزمایشات بر روی موش‌های ماده نژاد balb/c (تهیه شده از موسسه انستیتو پاستور کرج)، در سن ۸-۶ هفته‌ای و محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم انجام شد. کلیه مراحل آزمایشات درون‌تنی توسط کمیته اخلاق دانشگاه زابل تایید شد (IR.UOZ.REC.1401.012). موش‌ها تحت شرایط کنترل شده از لحاظ نور، دما و رطوبت در مرکز حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل نگهداری شدند.

ایجاد مدل سرطان دهانه رحم در موش: به منظور القای مدل توموری سرطان گردن رحم در موش، از رده سلول سرطانی دهانه رحم Hela استفاده شد که به میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در سالین استریل (۵×۱۰^{۶} سلول) به صورت زیر پوستی به ناحیه فلانک راست هر موش تزریق شد (۲۹). پس از گذشت ۱۰ روز و براساس حجم تومور، ۲۴ سر موش به چهار گروه (n=۶) تقسیم شدند.: گروه کنترل منفی (NC: Negative Control) (گروه موش‌های سالم که تحت عمل جراحی قرار نگرفتند و فقط سالین نرمال دریافت کردند)؛ گروه شم (sham) (گروه موش‌هایی که بدون دریافت هیچ نوع تیماری تحت عمل جراحی قرار گرفتند و فقط سالین نرمال دریافت کردند)؛ و گروه‌های درمانی (که دریافت‌کننده پپتید HL-10 با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بودند). تمام تیمارها به مدت سه هفته هر روز به صورت داخل صفاقی تزریق شدند.

سنجش فاکتورهای التهابی در سرم: تقریباً ۵ هفته پس از القای سرطان، موش‌ها با زایلازین (۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از باز کردن قفسه سینه با کمک قیچی و پنس استریل، با استفاده از سرنگ انسولین عمل خون‌گیری از قلب انجام شد. پس از انتقال خون به میکروتیوپ، نمونه مورد نظر به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیت‌های ELISA برای اندازه‌گیری IFN-γ، IL-4، IL-6 و IL-1β طبق پروتکل سازنده استفاده شد.

تهیه سلول‌ها از بافت توموری جهت سنجش بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cyt c: تومور جداسازی شده، در ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS با استفاده از کف سرنگ ۲ میلی‌لیتری خرد شد و تجمعات بافتی خارج گردید. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، بافت تومور از یک شبکه سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متری عبور داده شد. پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه (۳۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد حل گردید. پس از شمارش و سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی، از هر نمونه، سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱×۱۰^{۶} سلول تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه ای به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. سپس مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای انجام میزان بیان ژن، از روش Real time PCR استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت ۴×۱۰^{۶} سلول در محیط مکمل RPMI1640 کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های Hela، با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومولار از پپتید HL-10 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس جداسازی RNA توسط کیت Denazist Co. Mashhad, Iran از سلول‌ها استخراج گردید. پس از آن، کیت Kiagene Fanavar, Tehran, Iran، برای سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا مخلوطی شامل ۳ میکرولیتر RNA کل، ۱ ماکرولیتر پرایمر الیگو dT و ۱۰ ماکرولیتر آب عاری از نوکلئاز تهیه گردید و به دنبال آن، محلول حاصله به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به مخلوط ایجاد شده، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۶ میکرولیتر بافر PCR 5X و یک میکرولیتر آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس اضافه شد و به ترتیب انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان ۵ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زمان ۵ دقیقه انجام شد. درنهایت

cDNA ساخته شده از RNA، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره گردید.

Real time PCR: واکنش RT-PCR، در دستگاه Real Time PCR (مدل X960B) انجام شد. در هر واکنش، محلول‌های مورد استفاده شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green PCR master mix، یک میکرولیتر cDNA، ۳ میکرولیتر پرایمر و ٦ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بودند و زمان و دمای مناسب برای انجام واکنش‌ها، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه تنظیم گردید. از ژن GAPDH، به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرها برای آنالیز Real time PCR در جدول ۱ آمده است.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPadPrism و آزمون ANOVA و Tuckey تجزیه‌وتحلیل شدند نمودارها با نرم‌افزار GraphPadPrism رسم شدند. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1- Sequences of primers used in this study

Genes	Primer sequences 5′ 3′
GAPDH	Forward: AGCCAAAAGGGTCATCATC Reverse: TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG
Bcl-2	Forward: GGACCCAGAATACCAAGTGCAG Reverse: GTTGCTGGTGAGTGTGCATTCC
CytC	Forward: AAGGGAGGCAAGCACAAGACTG Reverse: CTCCATCAGTGTATCCTCTCCC
Bim	Forward: TAAGTTCTGAGTGTGACCGAGA Reverse: GCTCTGTCTGTAGGGAGGTAGG

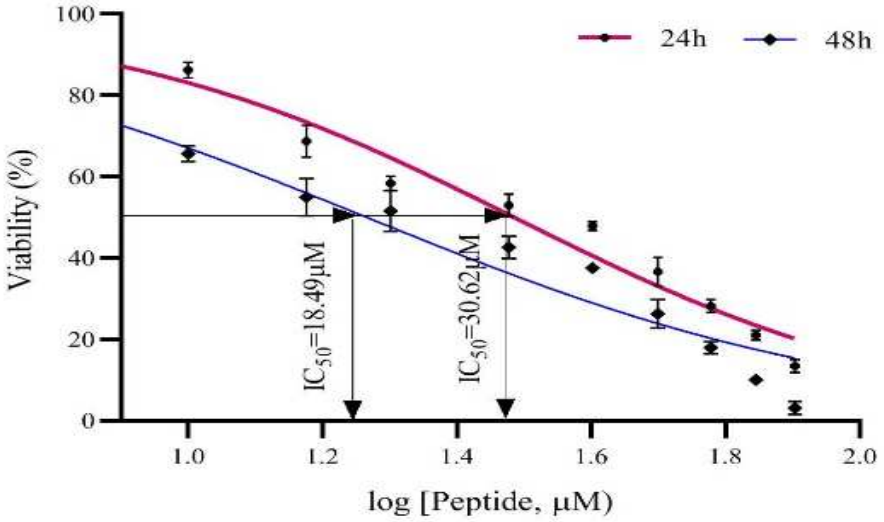
نتایج

درصد زیست‌پذیری سلولی و محاسبه IC50: نتایج سنجش MTT نشان داد که ارتباطی معکوس میان درصد زنده مانی سلول‌های زنده سرطانی HeLa تیمار شده با غلظت‌های مختلف پپتید HL-10 و سلول‌های بدون تیمار وجود داشت، بطوریکه با افزایش غلظت پپتید HL-10، درصد سلول‌های زنده تیمار شده کاهش نشان داد (p < ۰/۰۵). مقدار IC50 برای پپتید HL-10 در زمان ۲٤ ساعت، ۱۸/٤۹میکرومولار و در زمان ٤۸ ساعت، ۳۰/٦۲ میکرومولار بدست آمد (شکل ۱).

بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cytc: شکل دو، بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cytc در سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela تیمارشده با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومولار در شرایط برون‌تنی و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه در مطالعات برون‌تنی نشان داد که پپتید HL-10، اثر معناداری بر روی بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cytc داشت، بدین صورت که پپتید Hl-10، سبب افزایش معنادار بیان ژن Bim و Cytc در سلول‌های سرطانی تیمار شده نسبت به سلول‌های بدون تیمار شد، در حالیکه تغییرات بیان ژن برای Bcl-2 کاهشی بود (p < ۰/۰۵). همچنین نتایج مطالعات درون‌تنی نشان داد که بیان ژن‌های Bim و Cytc در گروه موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، افزایش داشت، در صورتی‌که بیان ژن Bcl-2 کاهش معناداری نشان داد

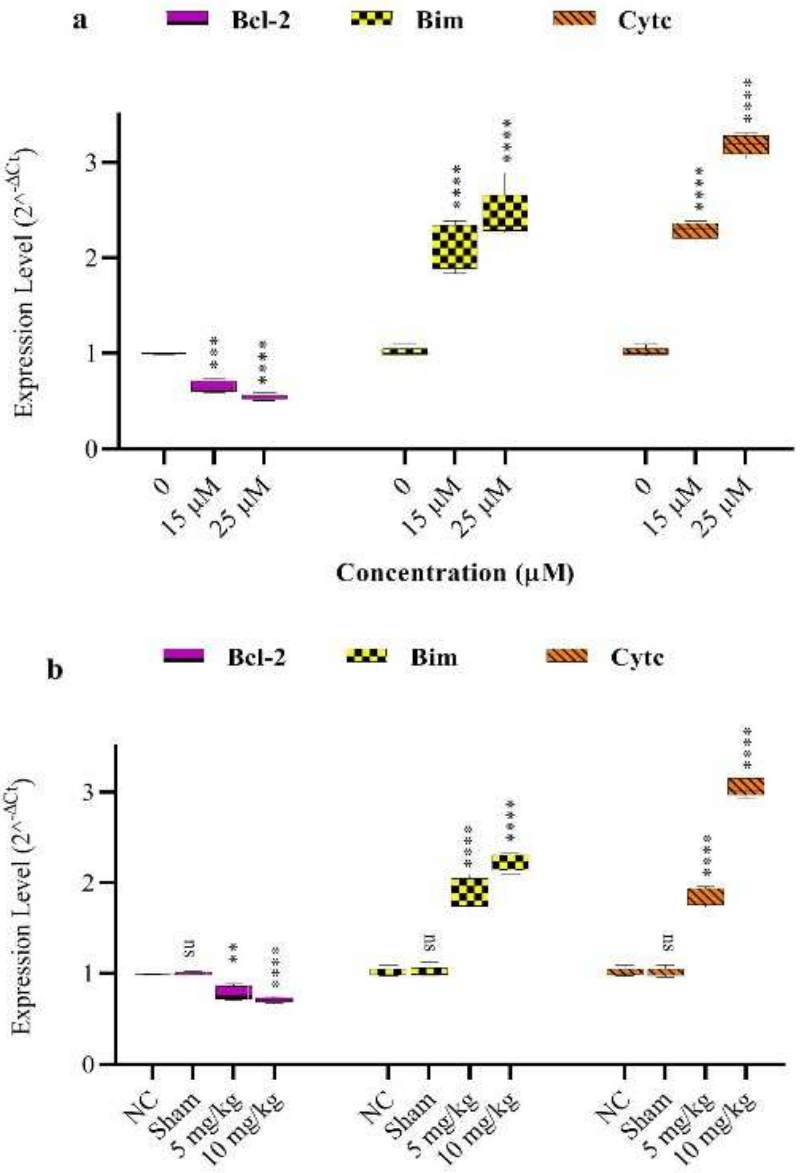
(p < ۰/۰۵). میان بیان هر سه ژن مورد مطالعه گروه موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) در مقایسه با گروه موش‌های سالم بدون تیمار (NC) اختلاف معناداری دیده نشد (p < ۰/۰۵).

فاکتورهای التهابی: همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، مقادیر IFN-γ در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) و موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار کمتر بود. سطوح این فاکتور میان سرم موش‌های سرطانی تیمار شده با دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری نداشت (p < ۰/۰۵). در حالیکه سطوح IFN-γ موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham) در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معناداری نشان داد (p < ۰/۰۰۱). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت IL-4 در سرم موش-های سرطانی بدون تیمار (Sham) نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) افزایش معناداری نشان داد. سطوح سرمی IL-4 در موش‌های سرطانی تیمار شده با ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 نسبت به موش‌های سرطانی بدون تیمار (Sham)، کاهش معناداری داشت (p < ۰/۰۰۱). میان سطوح این سایتوکاین در موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد (p < ۰/۰۵). نتایج نشان داد که غلظت IL-6 و IL-1β در سرم موش‌های سرطانی بدون تیمار نسبت به موش‌های سالم بدون تیمار (NC) کاهش معناداری نشان داد. میان سطوح IL-6، در موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد (p < ۰/۰۵). همچنین میان سطوح IL-1β موش‌های سرطانی تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار (NC) تفاوت معناداری دیده نشد (p < ۰/۰۵).



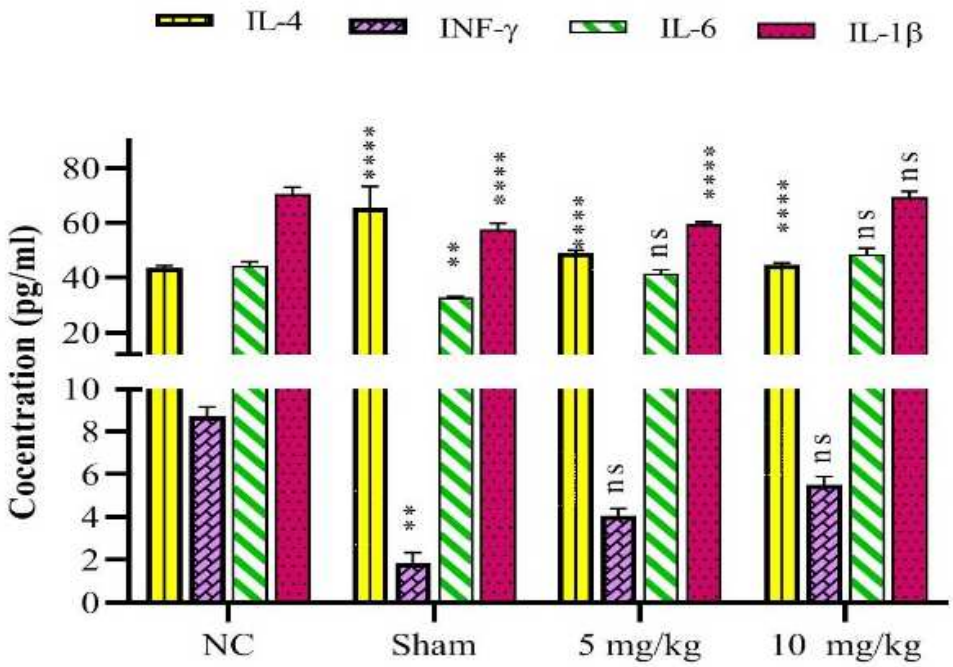
شکل ۱- منحنی دوز پاسخ حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی دهانه رحم HeLa با غلظت‌های مختلف پپتید HL-10 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت.

Fig. 1. The dose-response curve shows the impact of HL-10 peptide treatment at varying concentrations on HeLa cervical cancer cells at the 24- and 48-hour time points.



شکل ۲- نتایج Real time PCR ژن های BCL-2، Bim و Cyt c در سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela (a) و سلول‌های بافت تومور در مدل موش‌های balb-c دارای سرطان دهانه رحم تیمار شده با پپتید HL-10. ۰، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار: میزان بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Cyt c در سلول‌های سرطانی دهانه رحم Hela تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار پپتید HL-10. NC: کنترل منفی (گروه موش‌های سالم تیمار نشده)؛ Sham: گروه شم (گروه موش‌های سرطانی تیمار نشده)؛ ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه موش‌های سرطانی و تیمارشده با پپتید HL-10 در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). ****، بیانگر اختلاف معنادار میان بیان ژن‌های مذکور و نمونه کنترل بدون تیمار است (p < ۰/۰۰۰۱).

Fig. 2. The real-time PCR findings of the BCL-2, Bim, and Cyt c genes in Hela cervical cancer cells (a) and tumor tissue cells in the balb-c mice model with cervical cancer treated with HL-10 peptide are as follows: The expression levels of the Bcl-2, Bim, and Cyt c genes in Hela cervical cancer cells were measured after treatment with doses of 0, 15, and 25 µM of the HL-10 peptide. NC refers to the negative control, which is a group of healthy mice that were not treated. Sham refers to the Sham group, which is a group of cancer mice that were also not treated. The 5 and 10 mg/kg groups are groups of cancer mice that were treated with the HL-10 peptide at two different concentrations: 5 mg/kg and 10 mg/kg. **** denotes a significant difference in the expression of the specified genes compared to the control sample that did not receive any treatment (p < 0.0001).



شکل ۳- سطوح سرمی INF- γ ، IL-4، IL-6 و IL-1β پس از القای سرطان با رده سلولی Hela در گروه‌های تیمار شده با پپتید HL-10. NC: کنترل منفی (گروه موش‌های سالم تیمار نشده با پپتید HL-10)؛ Sham: شم (گروه موش‌های سرطانی تیمار نشده با پپتید HL-10)؛ ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گروه موش‌های سرطانی و تیمار شده با پپتید HL-10 در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم). ** $p < ۰/۰۱$ و ***$p < ۰/۰۰۰۱$، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار میان بیان ژن‌ها میان سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در مقایسه با کنترل بدون تیمار است.

Fig. 3. In groups treated with HL-10 peptide, serum concentrations of INF-, IL-4, IL-6, and IL-1β were measured subsequent to cancer induction using the Hela cell line. NC represents the negative control, which consisted of healthy mice that were not exposed to the HL-10 peptide. Sham denotes the group of cancer mice that were not treated with the HL-10 peptide. The doses of HL-10 peptide administered to the cancer mice were 5 and 10 mg/kg. Significant differences in gene expression were observed between cancer cells treated with HL-10 peptide and untreated control cells, as indicated by ** (p<0.01) and ***(p<0.0001).

بحث

یکی از راهبردهای مهم در درمان سرطان، حذف هدف‌مند سلول‌های سرطانی از طریق القاء آپپتوز است (٤، ٥). در این مطالعه، اثر پپتید HL-10 بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت انجام شد. نتایج بیانگر کاهش زنده‌مانی و افزایش سمّیت سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در یک روند وابسته به دوز و زمان بود. مقدار IC50 برای پپتید HL-10 در زمان ٢٤ ساعت، ١٨/٤٩ میکرومولار و در زمان ٤٨ ساعت، ٣٠/٦٢ میکرومولار بدست آمد. Satitmanwiwat و همکاران (٢٠١٦)، اثر پپتید BmKn-2 استخراج شده از سم عقرب را بر سلول‌های سرطانی و طبیعی دهانی بررسی کردند. نتایج تیمار سلول‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت توسط BmK-2 نشان داد که پپتید مذکور، از طریق القاء فرایندهای آپپتوز، دارای اثرات سمّیت سلولی قوی بر سلول‌های سرطانی دهان بود. همچنین نتایج آنها نشان داد که در غلظت‌هایی پپتید سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند. در همان غلظت‌ها، زیست‌پذیری سلولی و القاء آپپتوز در سلول‌های طبیعی، تحت تأثیر قرار نگرفت (٢٥). القاء آپپتوز توسط پپتید BmK-2 در سلول‌های سرطانی، در ارتباط با فعال‌سازی بیان ژن

p53، افزایش بیان ژن Bax و کاهش Bcl-2 بود (۲۵). نتایج آنالیز Real Time PCR نشان داد که پپتید HL-10، سبب کاهش بیان ژن Bcl-2 و افزایش بیان ژن‌های BIM و Cytc در سلول‌های سرطانی تیمار شده با پپتید نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار شد. مطالعات نشان داده است که ملیتین، به‌عنوان ترکیبی مهم در سم زنبور عسل، خاصیت ضدسرطانی خود را از طریق افزایش بیان ژن Bax و کاهش Bcl-2 بر دو رده سلولی سینه و کبد نشان داد (۸). همچنین، مون و همکاران، اثر سم زنبور عسل را بر سلول‌های سرطانی لوسمی U937 بررسی کردند. نتایج بیانگر آن بود که زهر زنبور عسل سبب کاهش بیان ژن‌های ERK و Bcl-2 شده و بدین‌صورت سبب آغاز فرایند آپپتوز می‌شود (۱۷). در گزارش قبلی‌مان، دو پپتید HL-7 و HL-10، اثرات ضدتوموری خود را بر سلول‌های سرطانی کبدی HepG2 از طریق افزایش بیان TNF-α، و همچنین افزایش نسبت Bax به Bcl-2 نشان دادند (۲۸). در مطالعه حاضر، خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 از طریق فرآیند آپپتوز بررسی گردید. این ویژگی، بواسطه افزایش بیان ژن‌های Bim و Cytc و همچنین کاهش بیان ژن Bcl-2 نشان داده شد. در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی، تغییرات در بیان ژن‌های مورد مطالعه در سلول‌های Hela تیمار شده با پپتید HL-10 نسبت به سلول‌های بدون تیمار معنادار بود ($p<0.05$). لی و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که تیمار موش‌های balb/c حامل سرطان دهانه رحم با سم زنبور عسل سبب افزایش بیان گیرنده‌های مرگ (DR, DR3, DR6, FAS) و همچنین پروتئین‌های پروآپپتوزی (کاسپاز ۳ و Bax)، و کاهش بیان Bcl-2 و NF-kB گردید. این نتایج بیانگر مهار رشد سلول‌های سرطانی دهانه رحم از طریق مهار مسیر NF-Kb بود. نتایج نشان داد که توکسین‌های طبیعی سم زنبور عسل، به عنوان عوامل ضدسرطانی از طریق فعال‌سازی مسیر بیرونی آپپتوز سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی دهانه رحم شدند (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که اسکولوپین ۲ (Scolopin-2)، پپتید کاتیونی استخراجی از سم هزارپا، اثرات ضدسرطانی داشت. بررسی‌های بیشتر در این رابطه نشان داد که این پپتید مسیر آپپتوز درونی وابسته به میتوکندری را در سلول‌های سرطانی Hela تحریک کرده و درصد زنده مانی سلولی را با روشی وابسته به دوز کاهش داد (۳۲). نتایج تحقیقی نشان داد که پپتید لیکوزین-۱ (Lycosin-1)، استخراجی از سم عنکبوت *Lycosa singoriensis*، با کانفورماسیون آلفا هلیکال خطی خود سبب مهار رشد سلول‌های توموری در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی گردید. لیکوزین ۱ با غلظت ۴۰ میکرومولار بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها را در رده سلول سرطانی انسانی از جمله H1080، H1299، Hela و A549 مهار کرد. نتایج بیانگر ورود پپتید به درون سلول و فعال سازی مسیر آپپتوز درونی، افزایش بیان ژن P27 و متعاقبا مهار تکثیر سلولی بود (۱۳). همچنین تحقیقات درون‌تنی در موش‌های حامل زنوگرافت Hela، H1299 و A549 انجام شد. نتایج نشان داد که پپتید لیکوزین ۱ سبب مهار رشد تومورهای کاشته شده در یک روش وابسته به دوز گردید. علاوه بر این سلول‌های بافت توموری تیمار شده با پپتید لیکوزین تغییرات موروفولوژیکی در ارتباط با آپپتوز را نشان دادند (۱۳). در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن‌های Bim و Cytc و کاهش بیان Bcl-2 می‌تواند بیانگر فعال سازی مسیر درونی آپپتوز در سلول‌های سرطانی دهانه رحم در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی باشد. مطالعات در محیط تومور، بیانگر تغییر ترشح برخی از سایتوکاین‌ها، تکثیر سلول‌های ایمنی و کاهش پاسخ ایمنی است (۷). سایتوکاین‌های ترشح شده از سلول‌های T کمکی نوع یک (Th1: type 1 T helper)

(مانند IFN-γ)، سبب تقویت خواص ضدسرطانی شده و از طریق فعال‌سازی لنفوسیت‌های T کشنده (CTLs: cytotoxic T lymphocytes) مانع رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۹). مطالعات نشان داده است که برخلاف IFN-γ، مقدار اینترلوکین ٤ (IL-4) مترشحه از سلول‌های Th2، به طور معناداری در طول رشد و گسترش سلول‌های سرطانی افزایش یافت (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از گذشت ۵ هفته تزریق سلول‌های سرطان دهانه رحم Hela و متعاقبا القای تومور در موش‌های balb/c، افزایش معناداری در سطوح سرمی IFN-γ در موش‌های سرطانی تیمار شده با پپتید HL-10 در مقایسه با موش‌های سالم بدون تیمار دیده شد، در حالیکه کاهش قابل توجهی در سطوح سرمی IL-4 مشاهده گردید. در مطالعه ای، اثرات ضدسرطانی و تنظیم-کنندگی سیستم ایمنی پپتید LyeTxI-b، استخراجی از سم عنکبوت *Lycosa erythrognatha*، در مدل موش حامل زنوگرافت 4T1 بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمار با پپتید LyeTxI-b، بیان فاکتور پیش‌التهابی IL-1β را در بافت تومور مهار کرد. از سوی دیگر، بیان فاکتور ضدالتهابی IL-10 در بافت توموری تیمار شده با پپتید افزایش پیدا کرد (۱). در گزارشی، فعالیت ضدتوموری و اثرات تحریک کننده ایمنی الیگوپپتیدهای صدف خوراکی در موش‌های balb/c حامل S180 بررسی گردید. نتایج مطالعه نشان داد که فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی، تکثیر لنفوسیت‌ها در طحال و میزان فاگوسیتوز ماکروفاژها در موش‌های حامل S180 بطور قابل توجهی پس از تزریق هیدرولیزات‌های صدف به موش‌ها افزایش یافت (۳۰). در مطالعه دیگر، توانایی سم عقرب *Heteroctenus juneus* بر تنظیم و تعدیل غلظت سایتوکاین‌ها بررسی گردید. در این مطالعه، غلظت سایتوکاین‌های بافت تومور پس از تیمار موش‌های حامل سلول‌های F3II با دوزهای مختلف سم به مدت ۲٤ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان داد که سم عقرب قادر به کاهش غلظت IL-6، IFN- γ و IL-1β بود، در حالیکه سطوح IL-12 و TNF-α را بر اساس غلظت سم و طول دوره انکوباسیون آن افزایش داد (۳۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر IFN-γ، IL-6 و IL-1β در موش‌های حامل سلول‌های Hela تیمار شده با دو غلظت از پپتید HL-10 نسبت به موش‌های حامل سلول‌های Hela بدون تیمار افزایش نشان داد، در حالیکه مقدار IL-4 کاهش معناداری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). به نظر می‌رسد که پپتید HL-10 سیستم ایمنی موش‌های balb/c حامل سلول‌های سرطانی دهانه رحم تحریک کرده که منجر به فعالیت ضدتوموری آن می‌گردد. اثرات تحریک کنندگی پپتید HL-10 بر سیستم ایمنی، خاصیت درمانی پپتید را در بیماری سرطان نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، اثر پپتید HL-10 بر بیان ژن‌های Bcl-2، Bim و Ctyc دخیل در تنظیم برنامه سلولی آپوپتوز مورد تایید قرار گرفت این گزارش، بیانگر دخیل بودن احتمالی پپتید HL-10 در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز سلولی و درنهایت مرگ سلولی است. یکی دیگر از عوامل موثر در اثرات ضدتوموری پپتید HL-10 را می‌توان به تنظیم سیستم ایمنی از طریق تغییر در سطوح سایتوکاین‌ها نسبت داد. در آینده، مطالعات بیشتری در مورد آپوپتوز و ابعاد مولکولی آن و همچنین بررسی بیشتر در زمینه تعدیل سیستم ایمنی برای تایید خواص ضدسرطانی پپتید HL-10 مورد نیاز است.

منابع

1. Abdel-Salam M.A.L., Pinto B., Cassali G., Bueno L., Pegas G., Oliveira F., Silve I., Klein A., de Souza-Fagundes E.M., de Lima M.E., Carvalho-Tavares J., 2021. LyeTx I-b peptide attenuates tumor burden

and metastasis in a mouse 4T1 breast cancer model. *Antibiotics (Basel)*, 10(9):1136.

2. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17:189-220.

3. Gao L., Shan B.E., Chen J., Liu J.H., Song D.X., Zhu B.C., 2005. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26:369-376.

4. Gu Y., Liu S-L., Ju W-Z., Li C-Y., Cao P., 2013. Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncology letters*, 5(2): 483-488.

5. Guo Y., Srinivasula S.M., Druilhe A., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16): 13430-13437.

6. Gupta S.D., Gomes A., Debnath A., Saha A., Gomes A., 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-Biological Interactions*, 183:293-303.

7. Harirchi I., Karbaksh M., Kashefi A., Momtahen A.J., 2004. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 5(1):24-27.

8. Heidari Esfahani E., Doosti A., 2021. The Effects of melittin coding gene of bee venom on *Bcl-2* and Bax genes expression in ACHN cells. *Anatomical Sciences Journal*, 18(2):85-91.

9. Hoskin D.W., Ramamoorthy A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(2):357-375.

10. Jeyaprakash J., Hoy M.A., 2009. First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: *Chelicerata*) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*, 47(1):1-18.

11. Kawakami K., Kawakami M., Husain S.R., Puri R.K., 2003. Effect of interleukin (IL)-4 cytotoxin on breast tumor growth after in-vivo gene transfer of IL-4 receptor alpha chain. *Clinical Cancer Research*, 9(5):1826-1836.

12. Lee H.L., Park S.H., Kim T.M., Jung Y.Y., Park M.H., Oh S.H., Yun H.S., Jun H.O., Yoo H.S., Han S.B., Lee U.S., Yoon J.H., Song M.J., Hong J.T., 2015. Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice. *Oncotarget*, 6(9):7280-7292.

13. Liu Z., Deng M., Xiang J., Ma H., Hu W., Zhao Y., Li D.W.C., Liang S., 2012. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways. *Current Molecular Medicine*, 12(10):1350-1360.

14. Meki A.R., Nassar A.Y., Rochat H., 1995. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*, 16(8): 1359-1365.

15. Mikaelian A.G., Traboulay E., Zhang X.M., Yeritsyan E., Pedersen P.L., Hee Ko.Y., Matalka K.Z., 2020. Pleiotropic Anticancer properties of scorpion venom peptides: *Rhopalurus princeps* venom as an anticancer agent. *Drug Design, Develop and Therapeutics,* 14:881-893.

16. Miyashita M., Sakai A., Matsushita N., Hanai Y., Nakagawa Y., Miyagawa H., 2010. A novel amphipathic linear peptide with both insect toxicity and antimicrobial activity from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. Bioscience, *Biotechnology, and Biochemistry*, 74(2): 364-369.

apoptosis in cancerous but not in normal human oral cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 1042-1050.

26. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., 2017. The inhibitory activity of HL-7 and HL-10 peptide from scorpion venom (*Hemiscorpius lepturus*) on angiotensin converting enzyme: Kinetic and docking study, *Bioorganic Chemistry*, 75:30-37.

27. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., 2019. Inhibitory effect of HL-7 and HL-10 peptides on human breast cancer cells by induction of the expression of antioxidant enzymes. *International Journal of Peptide Science and Therapeutics*, 25(40):1343-1341.

28. Setayesh-Mehr Z., Asoodeh A., Poorsargol M., 2021. Upregulation of Bax, TNF-α and down-regulation of Bcl-2 in liver cancer cells treated with HL-7 and HL-10 peptides. *Biologia,* 76:2735-2743.

29. Sun X., Xu Q., Zeng L., Xie L., Zhao Q., Xu H., Wang X., Jiang N., Fu P., Sang M., 2020. Resveratrol suppresses the growth and metastatic potential of cervical cancer by inhibiting STAT3Tyr705 phosphorylation. *Cancer Medicine*. 9(22):8685-8700.

30. Wang Y.K., He H.L., Wang G.F., Wu H., Zhou B.C., Chen X.L., Zhang Y.Z., 2010. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Marine Drugs*, 8(2):255-268.

31. Willems J., Moerman L., Bosteels S., Bruyneel E., Ryniers F., Verdonck F., 2004. Parabutoporin an antibiotic peptide from scorpion venom can both induce activation and inhibition of granulocyte cell functions. *Peptides*, 25(7):1079-1084.

32. Yan W., Lu J., Li G., Wei H., Ren W.H., 2018. Amidated Scolopin-2 inhibits proliferation and induces apoptosis of Hela cells *in vitro* and *in vivo*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65:672-679.

17. Moon D-O., Park S-Y., Heo M-S., Kim K-C., Park C., Ko W.S., 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are *Bcl-2* and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International immunopharmacology*, 6(12):1796-1807.

18. Ortiz E., Gurrola G.B., Schwartz E.F., Possani L.D., 2015. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93:125-135.

19. Otsuki N., Dang N.H., Kumagai E., Kondo A., Iwata S., Morimoto C., 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3):760-767.

20. Petricevich V.L., Lebrun I., 2005. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in-vitro. *Mediators of Inflammation*, 1:39-49.

21. Pipelzadeh M.H., Dezfulian A.R., Jalali M.T., Mansori A.K. 2006. *In vitro* and *in vivo* studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpious lepturus* scorpion. *Toxicon*, 48: 93-103.

22. Piperi C., Zisakis A.W., Lea R., Kalofoutis A., 2005. Role of cytokines in the regulation of glioma tumour growth and angiogenesis. *American Journal of Immunology*, 1:106-113.

23. Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J., 1999. Scorpion toxins specific for Na^+-channels. *European Journal of Biochemistry*, 264:287-300.

24. Riedl S., Zweytick D., Lohner K. 2011. Membrane-active host defense peptides-challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8):766-781.

25. Satitmanwiwat S., Changsangfa C., Khanuengthong A., Promthep K., Roytrakul S., Arpornsuwan T., 2016. The scorpion venom peptide BmKn2 induces

33. Yglesias-Rivera A., Sánchez-Rodríguez H., Soto-Febles C., Monzote L., 2023. *Heteroctenus junceus* scorpion venom modulates the concentration of pro-inflammatory cytokines in F3II tumor cells. *Life (Basel)*, 13(12):2287.

34. Zeng X.C., Li W.X., Peng F., Zhu Z.H. 2000. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life*, 49(3):207-210.

35. Zeng X., Corzo G., Hahin R., 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life,* 57(1):13-21.