



مقاله پژوهشی

القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان 4T1 توسط یک پپتید مشتق شده از محصولات جانبی ماهی تن (*Thunnus tonggol*)

ریحانه چمنی^{۱*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22541.1472

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱

چکیده

سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. داروهای شیمی‌درمانی سمیت و عوارض جانبی بسیاری دارند. از این رو، طراحی داروهای طبیعی موثر با کمترین سمیت اهمیت فراوانی دارد. آبزیان منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال از جمله پپتیدها با خواص ضدسرطانی هستند. مطالعات نشان داده‌اند که یک پپتید ۱۱ اسید آمینه‌ای مشتق شده از هیدرولیز محصولات جانبی ماهیچه تیره ماهی تن (*Thunnus tonggol*) دارای خواص ضدسرطانی است. در مطالعه حاضر، اثر این پپتید بر زنده‌مانی رده سلولی سرطان پستان 4T1 با استفاده از روش MTT و القای آپوپتوز در این سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری و Real-time PCR بررسی شد. نتایج نشان دادند که این پپتید از زنده‌مانی سلول‌های سرطانی جلوگیری کرد و موجب القای ۳۰/۳ درصد آپوپتوز در این سلول‌ها شد. این پپتید از طریق کاهش بیان نسبی ژن ضدآپوپتوزی *BCL2* و افزایش بیان نسبی ژن پروآپوپتوزی *BAX* عمل می‌کند. بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که این پپتید قابلیت انجام بررسی‌های بیشتر برای مصارف درمانی و همچنین مکمل‌های دارای خواص پیشگیری از سرطان را دارد.

واژگان کلیدی: مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، *BCL2*، *BAX*، ضدسرطان.

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

* نویسنده مسئول: chamani@yazd.ac.ir

مقدمه

ترکیبات موثر با منشا طبیعی بویژه پپتیدها در حال انجام است. تقریباً ۷۰ درصد از سطح زمین را آب پوشانده است که مخزن عظیمی از مواد فعال زیستی جدید با ویژگی‌های شیمیایی کمیاب و خاص است. گونه‌های دریایی گنجینه‌ای از داروهای ضدسرطان هستند (Zhang et al., 2021). در دهه گذشته، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که محصولات دریایی می‌توانند به عنوان عوامل ضدتومور عمل کرده، نقش پیشگیرانه‌ای را در تشکیل تومورها ایفا کنند که زمینه‌ساز کشف داروهای جدید و کارآمد هستند. پپتیدهای زیست‌فعال قطعات خاصی از پروتئین‌ها هستند که فعالیت آنها بر اساس طول و نوع توالی اسید آمینه‌ای آنها متغیر است. در سال‌های اخیر، تعداد زیادی پپتید زیست‌فعال از موجودات دریایی جدا شده است که دارای فعالیت ضدسرطانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Eghtedari et al., 2021). از آنجایی که موجودات دریایی در محیط خاصی از نظر شوری، فشار و اکسیژن زندگی می‌کنند این پروتئین‌ها و پپتیدها دارای فعالیت‌های زیستی قوی و ساختار خاصی هستند (Zhang et al., 2021). از پپتیدهای کشف شده تاکنون

بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۹، سرطان اولین و یا دومین عامل مرگ و میر تا قبل از سن ۷۰ سالگی در ۱۱۲ از ۱۸۳ کشور جهان بوده است (Sung et al., 2021). روش‌های درمانی رایج برای سرطان‌های مختلف شامل شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی هستند. داروهای شیمی‌درمانی به دلیل عدم انتخابگری، عوارض جانبی زیادی دارند و اغلب اندام‌های سالم را هدف قرار می‌دهند (Huang et al., 2017). همچنین این داروها در معرض مقاومت دارویی ناشی از بیان بیش از حد ناقل‌های غشایی هستند که ممکن است داروهای ضدسرطان را از داخل سلول سرطانی خارج کنند و در نتیجه تجمع و کارایی دارو را کاهش دهند (Nikolaou et al., 2018). علاوه بر این، پرتودرمانی و جراحی احتمال تهاجم سرطان را افزایش می‌دهند. بر این اساس، توسعه داروهای ضدسرطان موثر و جدید به شدت مورد نیاز است. امروزه روش‌های مولکولی جدیدی برای درمان سرطان وجود دارد، از جمله هدف قرار دادن گیرنده‌های سطح سلول سرطانی، درمان مبتنی بر سیستم ایمنی و واکسن‌ها (Schirmacher, 2019). علاوه بر آنها پژوهش‌های گسترده‌ای برای به دست آوردن

ضدسرطانی آنها را افزایش می دهد (Zhang et al., 2021). با این حال، پپتیدهای کوچک دارای معایبی هستند، از جمله نیمه عمر کوتاه، تجزیه آسان در داخل بدن و پایداری ضعیف. به همین دلیل بسیاری از پژوهشگران سعی کرده اند داروهای پپتیدی را با تغییراتی اصلاح کنند و یا با درمان های سنتی برای دستیابی به نتایج بهتر نسبت به تک درمان ترکیب کنند (Henninot et al., 2018).

افزایش تقاضا برای مصرف ماهی به معنای ایجاد حجم بیشتری از ضایعات ماهی است. بنابراین صنایع فرآوری ماهی با استفاده از دورریزها یا محصولات جانبی ماهی می توانند به طور بالقوه درآمد اضافی ایجاد کنند و همچنین هزینه های دفع و آلودگی ها را کاهش دهند. محصولات جانبی ماهی حاوی پروتئین ها، چربی ها و اسیدهای آمینه هستند. هیدرولیزات پروتئین ماهی که از هیدرولیز محصولات جانبی و ضایعات ماهی به دست می آیند منبع اصلی پپتیدهای زیست فعال هستند که کاربردهای تغذیه ای و دارویی متعددی مانند درمان سرطان دارند (Gao et al., 2021). چندین مطالعه بر روی اثرات ضدتکثیری پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین ماهی های مختلف بر روی رده های سلول سرطانی انجام شده است

Eribulin و (E7974) Hemiasterlin Mesylate (Halaven®) توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای درمان سرطان پستان تایید شده اند. Plitidepsin (Aplidin®) و Keyhole Limpet Hemocyanin (Immucottel®) نیز برای سرطان های دیگر تایید شده است (Ghareeb et al., 2020).

دلایل متعددی وجود دارد که چرا پپتیدهای دریایی در راستای کشف داروهای ضدسرطان مورد توجه قرار گرفته اند. آنها مزایای قابل توجهی نسبت به پروتئین ها یا آنتی بادی ها دارند مانند اندازه کوچک، تولید ساده، اصلاح آسان ساختار و توالی، قابلیت عبور از غشای سلولی، تداخل کم دارو با دارو، عدم سمیت و ایمنی زایی، انتخابگری بالا، نفوذ بیشتر به داخل بافت ها و عوارض جانبی کمتر به دلیل عدم تجمع در کلیه ها یا کبد. علاوه بر این، پپتیدهای کوچک می توانند به عنوان ناقل برای رساندن دارو به طور خاص به هر سلول و بافت استفاده شوند (Henninot et al., 2018). در مقایسه با پپتیدهای با وزن مولکولی بالا، پپتیدهای با وزن مولکولی کم، انتشار و تحرک مولکولی بیشتری از خود نشان می دهند که به افزایش تعامل آنها با اجزای سلول سرطانی کمک می کند و فعالیت

آنها از داروی Lynparza بیشتر بود. در مطالعه دیگری Hsu و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از دو آنزیم پاپائین و پروتئاز XXIII محصول جانبی ماهیچه تیره ماهی تن (*Thunnus tonggol*) را هیدرولیز و سپس تخلیص کردند. آنها نشان دادند که یک پپتید یازده اسید آمینه‌ای با توالی PTAEGGVYMT قادر به مهار تکثیر رده سلولی MCF-7 بود (Hsu et al., 2011). هرچند اثرات ضدتکثیری پپتیدهای مختلف مطالعه شده است، اما برای اطمینان از اثر ضدسرطانی آنها به مطالعه مسیرهای مولکولی بیشتری نیاز است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی بیشتر فعالیت ضدسرطانی پپتید یازده اسید آمینه‌ای به دست آمده در مطالعه Hsu و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد که در مطالعه پیش رو به نام پپتید PT خوانده می‌شود و اثر آن بر زنده‌مانی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در رده سلول سرطان پستان 4T1 سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

ساخت پپتید PT با توالی H₂N-P-T-A-E-G-G-V-Y-M-V-T-COOH که در مطالعات قبلی از محصولات جانبی ماهی تن (*Thunnus tonggol*) به دست آمده بود (Hsu

Shaik and Sarbon, 2020; Ahmed et al., 2021). به عنوان مثال، هیدرولیز پروتئین مشتق شده از ماهیچه ماهی Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) با آنزیم پاپائین فعالیت ضدتکثیر معنی‌داری علیه رده‌های سلولی سرطانی کولون Coco-2، پستان MCF-7 و کبد HepG2 نشان داد (You et al., 2011). Picot و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که ۱۸ نمونه تهیه شده از هیدرولیز پروتئین ماهی‌های مختلف فعالیت ضدتکثیری بالایی را علیه دو رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 و MCF-7 با میانگین مهار رشد ۲۵ درصد نشان داد. ربیعی و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز میکروبی عضله ماهی مید (*Liza klunzingeri*) به طور معنی‌داری قادر به مهار زنده‌مانی رده سلول سرطان پستان 4T1 است. همچنین عزیزی و همکاران (۱۴۰۰) پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از سه کیلوالتون را که از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های امعا و احشای ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) به دست آمده بود بر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 بررسی کردند و نشان دادند که این پپتیدها به طور قابل توجهی از رشد سلول‌ها جلوگیری کردند و اثر

۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ میکرومولار از پپتید PT تیمار شدند (با سه تکرار). بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌ها با بافر فسفات نمکی (PBS) شستشو داده شدند. پس از آن، محلول MTT (Sigma-Aldrich، آمریکا) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و برای ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط کشت حذف شد و ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO (Sigma-Aldrich، آمریکا) به نمونه‌ها اضافه شد تا فورمازان تشکیل شده تثبیت شود. مقدار جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج (BioTek، 800TS، آمریکا) ثبت شد. نمودار درصد زنده‌مانی در مقابل غلظت رسم شد و با استفاده از معادله خط مقدار IC_{50} یا نصف حداکثر غلظت بازدارندگی محاسبه شد. IC_{50} غلظتی است که در آن منحنی از سطح بازداری ۵۰ درصد عبور کند.

بررسی آپوپتوز در سلول‌های 4T1 با استفاده از

روش Annexin V-FITC/PI

القای آپوپتوز در سلول‌های 4T1 با استفاده از کیت Annexin V-FITC/PI (Abcam، انگلستان) بر طبق دستور العمل شرکت سازنده بررسی شد. به طور خلاصه، 10^5 سلول در پلیت

(et al., 2011) با خلوص ۹۰ درصد به شرکت Shine Gene Biotechnologies, Inc. (شانگهای، چین) سفارش داده شد. خلوص پپتید توسط شرکت سازنده با استفاده از کروماتوگرافی HPLC تایید شد.

کشت سلول‌ها

رده سلولی 4T1 که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده بود، در محیط کشت DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich، آمریکا) حاوی ۲۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی، Gibco Invitrogen، آمریکا) کشت شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد تا رسیدن به تراکم ۷۰ درصد نگهداری شد. از پاساژ ۳ تا ۵ برای آزمایش‌ها استفاده شد.

بررسی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 به روش

MTT

سنجش MTT بر اساس توانایی سلول‌های زنده و فعال برای تبدیل رنگ محلول دی فنیل تترازولیوم بروماید به فورمازان نامحلول انجام شد. سلول‌های 4T1 در پلیت ۹۶ چاهک به تعداد 5×10^3 سلول در هر چاهک کشت و به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵،

صورت سه تکرار مستقل انجام شد. تمام RNA استخراج شده با استفاده از باند ۱۸S rRNA و ۲۸S rRNA روی ژل آگارز پس از الکتروفورز تایید شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده از طریق نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, 2000) بررسی شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر آنها بین ۱/۸ تا ۲ بود خالص در نظر گرفته شدند. RNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (SMOBIO, تایوان) و PCR رونوشت‌برداری معکوس (-RT-PCR) بر طبق دستور العمل شرکت به DNA مکمل (cDNA) رونوشت‌برداری شد.

PCR کمی (Quantitative Real-Time PCR) ژن‌های *BCL2* (ضدآپوپتوز) و *BAX* (پروآپوپتوز، Proapoptotic) با استفاده از دستگاه Qiagen Rotor-Gene Q (آلمان) و مستر میکس سبز RealQ Plus 2x فاقد ROX™ حاوی TEMPase Hot Start DNA Polymerase و بافر حاوی نوکلئوتیدها و رنگ فلورسنت (Ampliqon)، دانمارک، شماره کاتالوگ A323402) انجام شد. آغازگرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner 6 طراحی شدند (جدول ۱). برنامه سه مرحله‌ای PCR به این شرح بود: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه،

۲۴ چاهک به مدت یک شبانه‌روز کشت شد و سپس با غلظت ۲۲ میکرومولار پپتید PT تیمار شد. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها با PBS شسته و تریپسینه شدند. سلول‌های جدا شده از کف پلیت جمع‌آوری و در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول‌ها در بافر اتصال معلق شدند، سپس ۵ میکرولیتر آنکسین V-FITC و ۵ میکرولیتر Propidium Iodide (PI) اضافه و به مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگه داشته شدند. سپس اتصال رنگ‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر (MACSQuant Analyser 10, Miltenyi Biotec, آلمان) و نرم‌افزار MACSQuantify بررسی شدند. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. از سلول‌های تیمار نشده به عنوان شاهد استفاده شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و Real-time PCR

سلول‌های 4T1 با غلظت ۲۲ میکرومولار پپتید PT تیمار و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سلول‌های تیمار نشده به عنوان شاهد منفی استفاده شدند. RNA تام سلول‌ها با استفاده از معرف Trizol (Invitrogen، آمریکا) و بر طبق دستور العمل شرکت سازنده استخراج شد. تمام مراحل استخراج تحت شرایط عاری از RNase و به

۴۰ دور دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. ژن خانه‌دار گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST (Qiagen، آلمان) آنالیز شدند. از رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها استفاده شد. میزان بیان نسبت به سلول‌های تیمار نشده بود.

بررسی آماری

نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شده است. برای مقایسه بین دو گروه از آزمون *t* استفاده

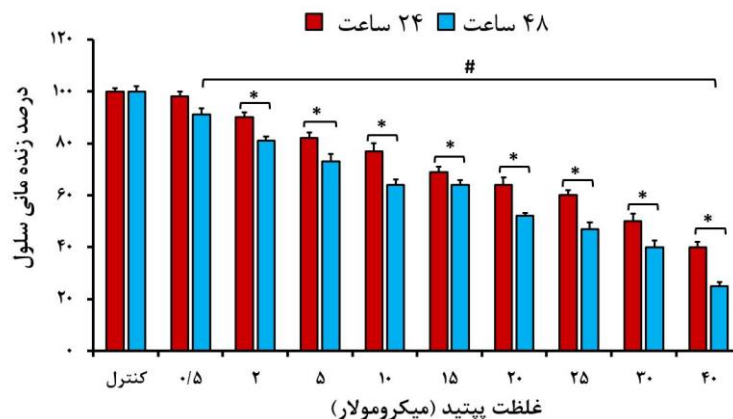
نتایج

اثر پپتید PT بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی نتایج آزمایش MTT که برای سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ میکرومولار پپتید PT استفاده شد، نشان داد که این پپتید موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت و زمان شد ($P < 0/01$ ؛ شکل ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR

ژن	توالی آغازگر (۵' ← ۳')	اندازه آغازگر (نوکلئوتید)	اندازه محصول (جفت باز)
<i>BCL2</i>	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	۲۲ ۲۳	۱۲۷
<i>BAX</i>	F: ATGTTTTCTGACGGCAACTTC R: AGTCCAATGTCCAGCCCAT	۲۱ ۱۹	۱۳۳
<i>GAPDH</i>	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG R: TCTAGACGGCAGGTCAGGTC	۲۰ ۲۰	۲۰۰

F: آغازگر پیشرو؛ R: آغازگر پیرو.



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف پپتید PT بر زنده‌مانی سلول‌های 4T1 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون با استفاده از سنجش MTT (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). علامت «#» نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با شاهد و علامت «*» بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت است ($P<0/01$).

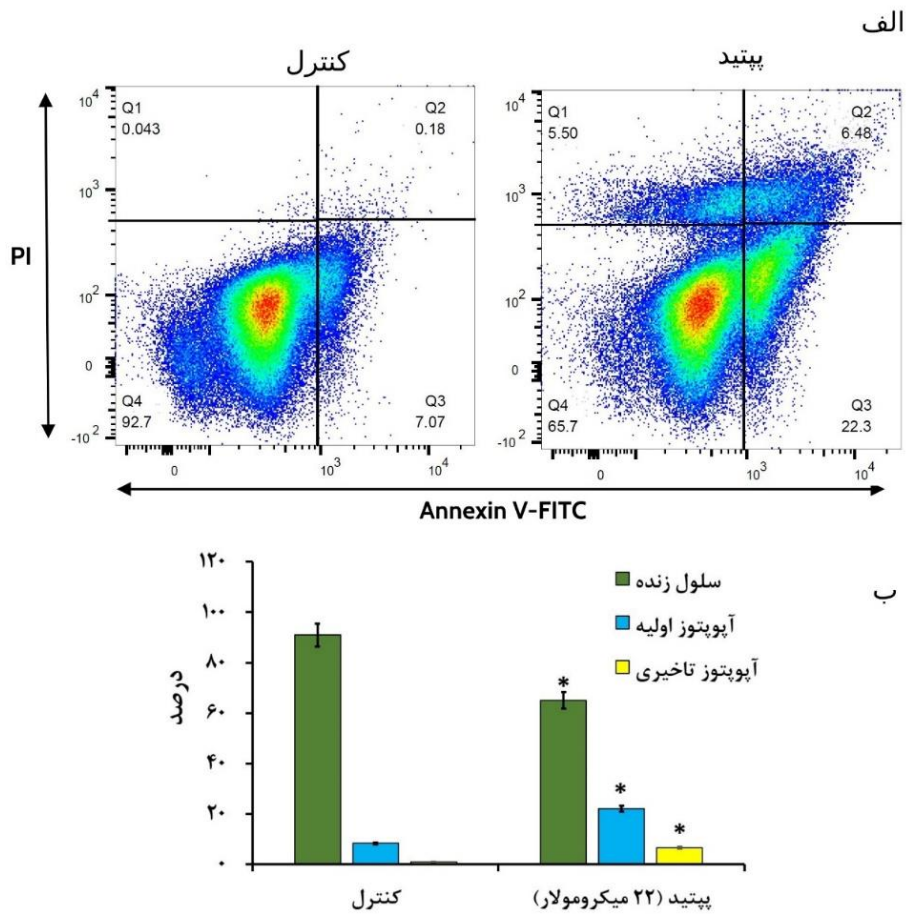
آمد. به دلیل وجود اختلاف آماری معنادار بین دو زمان انکوباسیون، غلظت IC_{50} در زمان ۴۸ ساعت یعنی ۲۲ میکرومولار برای آزمایش‌های دیگر به کار گرفته شد.

مثبت بود و نشان دهنده سلول‌ها در مراحل آخر آپوپتوز است؛ ناحیه Q1 که برای PI مثبت و برای آنکسین-FITC منفی بود و مشخص کننده سلول‌های مرده است. پپتید PT به ترتیب موجب ۲۳/۳ درصد آپوپتوز اولیه، ۷ درصد آپوپتوز تاخیری و در مجموع ۳۰/۳ درصد آپوپتوز در سلول‌ها شد که در مقایسه با ۸ درصد آپوپتوز در سلول‌های شاهد، اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/01$ ؛ شکل ۲-ب).

نصف حداکثر غلظت بازدارندگی یا IC_{50} که در آن رشد ۵۰ درصد از سلول‌ها متوقف می‌شود برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون با پپتید PT به ترتیب برابر با ۳۰ و ۲۲ میکرومولار به دست

اثر پپتید PT بر آپوپتوز سلول‌ها

در نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی آنکسین V-FITC/PI چهار ناحیه مشاهده شد (شکل ۲-الف). ناحیه Q4 که برای هر دو رنگ آنکسین-FITC و PI منفی بود و نشان دهنده سلول‌های زنده است؛ ناحیه Q3 که برای PI منفی و برای آنکسین-FITC مثبت بود و مشخص کننده سلول‌ها در مرحله ابتدایی آپوپتوز است؛ ناحیه Q2 که برای هر دو رنگ



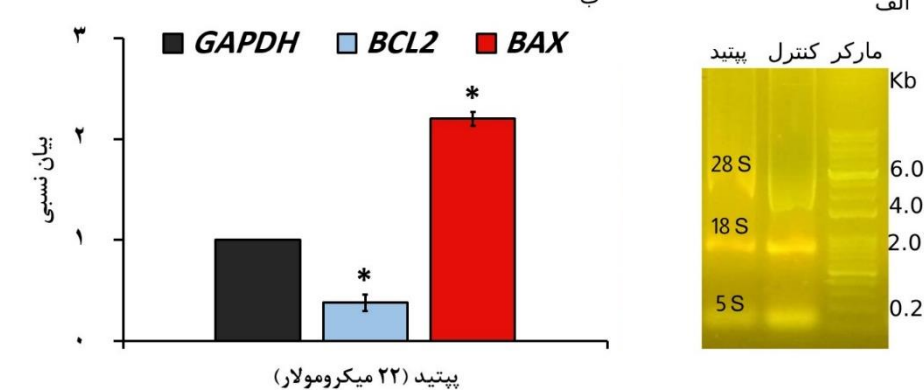
شکل ۲: اثر پپتید PT بر القای آپوپتوز در سلول‌های رنگ آمیزی شده با آنکسین V-FITC/PI. الف) نمودار نقطه‌ای به دست آمده از فلوسایتومتری. رنگ‌ها از قرمز تا آبی به ترتیب نشان دهنده تراکم زیاد تا کم سلول‌ها هستند. ب) نمودار درصد سلول‌های زنده و آپوپتوز شده بر اساس نمودار نقطه‌ای (میانگین \pm خطای استاندارد؛ n=۳). علامت «*» نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با شاهد است ($P < 0.01$).

اثر پپتید PT بر بیان ژن‌های *BAX* و *BCL2* نشده با استفاده از RT-qPCR سنجیده شد. میزان بیان نسبی ژن‌های ضدآپوپتوز *BCL2* و پرو آپوپتوز *BAX* در سلول‌ها پس از تیمار با پپتید PT در مقایسه با سلول‌های تیمار شکل ۳- الف باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA را پس از استخراج RNA، روی ژل آگارز پس از الکتروفورز نشان می‌دهد. همان گونه که در

شکل ۳- ب مشخص است، پپتید PT به طور معنی داری موجب کاهش بیان نسبی ژن *BCL2* و افزایش بیان نسبی ژن *BAX* (نسبت به سلول‌های تیمار نشده) شد ($P < 0/01$).

بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد که پپتید PT از زنده‌مانی رده سلولی سرطان پستان جلوگیری کرده و موجب القای ۳۰/۳ درصد آپوپتوز در این سلول‌ها شده است. این پپتید از طریق کاهش بیان نسبی ژن ضدآپوپتوزی



شکل ۳: اثر پپتید بر بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* در سلول‌های سرطانی. الف) باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA روی ژل آگارز پس از استخراج RNA برای نمونه‌های شاهد و تیمار با پپتید PT در کنار مارکر وزن مولکولی (Kb بیانگر کیلوباز است). ب) نمودار بیان نسبی ژن‌ها در مقایسه با ژن مرجع *GAPDH* (میانگین \pm خطای استاندارد؛ $n=3$). علامت «*» نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با شاهد است ($P < 0/01$).

ضدسرطان متعددی در مرحله کارآزمایی‌های بالینی هستند و مولکول‌های مختلفی را در مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز هدف قرار می‌دهند. دو مکانیسم درمانی رایج عبارت هستند از تحریک مولکول‌های پروآپوپتوز و مهار مولکول‌های ضدآپوپتوز. از میان آنها، Venetoclax یک مهارکننده اختصاصی پروتئین Bcl-2 است که برای درمان بزرگسالان مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)، لنفوم لنفوسیتی کوچک (SLL) یا لوسمی میلوئید حاد (AML) به تایید FDA رسیده است. هرچند، توسعه درمان‌های موثری که مسیرهای آپوپتوز را هدف قرار می‌دهند به دلیل تعدد اهداف درمانی که هرکدام مکانیسم‌های مقاومتی خاص، درمان‌های استاندارد متفاوت برای انواع مختلف تومور و شاخص سمیت متفاوتی دارند، بسیار پیچیده است (Carneiro and El-Deiry, 2020).

استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال برای درمان سرطان نسبت به پروتئین‌های نوترکیب، آنتی‌بادی‌ها و داروهای شیمی‌درمانی مزیت‌های عمده‌ای دارد که از آن جمله می‌توان به تولید آسان‌تر، تداخل کم دارو با دارو، عدم سمیت، ایمنی‌زایی، انتخاب‌گری بالا نسبت به گیرنده‌ها و مولکول‌های خاص و نفوذ بیشتر به داخل بافت‌ها

مسیر داخلی توسط گروهی از پروتئین‌های متعلق به خانواده Bcl-2 تنظیم می‌شود. دو گروه اصلی از پروتئین‌های Bcl-2 وجود دارد: پروتئین‌های پروآپوپتوز (مانند Bak, Bax, Bad, Bcl-Xs, Bik, Bid, Bim و Hrk) و پروتئین‌های ضدآپوپتوز (مانند Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 و Mcl-1). در حالی که پروتئین‌های ضدآپوپتوز با جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری، آپوپتوز را مهار می‌کنند، پروتئین‌های پروآپوپتوز از طریق تحریک این آزادسازی عمل می‌کنند (Kale et al., 2018).

فرار از آپوپتوز یکی از مشخصه‌های اصلی سلول‌های سرطانی است و نقش حیاتی در سرطان‌زایی دارد. از دست دادن کنترل آپوپتوز به سلول‌های سرطانی اجازه می‌دهد بیشتر زنده بمانند و زمان بیشتری برای تجمع جهش‌ها داشته باشند که این امر می‌تواند تهاجم را افزایش دهد و رگزایی را تحریک کند. یکی از راه‌های درمان سرطان، کنترل و یا پایان دادن به رشد کنترل نشده سلول‌های سرطانی است. هدف قرار دادن آپوپتوز برای تمام انواع سرطان‌ها موثر است، زیرا فرار از آپوپتوز مشخصه تمام سرطان‌ها است (Carneiro and El-Deiry, 2020). کاندیداهای دارویی

دادند که یک پپتید ۱۱ اسید آمینه‌ای به شیوه وابسته به غلظت و با IC₅₀ برابر با ۸/۸ میکرومولار قادر به مهار تکثیر رده سلولی MCF-7 است (Hsu et al., 2011). اما برای تایید خاصیت ضدسرطانی این پپتید نیاز به بررسی مکانیسم‌های مولکولی بیشتری است. از این رو، در مطالعه حاضر اثر پپتید ساخته شده بر القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پستان 4T1 مطالعه شد. مهم‌ترین دلیل استفاده از پپتید ساخته شده در این مطالعه به جای روش هیدرولیز محصولات جانبی ماهی، در دست داشتن مقادیر خالصی از توالی پپتیدی اشاره شده بود تا بتوان اثرات آن را سنجید و یک کاندیدای دارویی ضدسرطان با توالی مشخص را معرفی کرد. از دلایل دیگر می‌توان به سرعت و سهولت کار اشاره کرد. نتایج نشان دادند که این پپتید به صورت وابسته به غلظت و زمان از زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها جلوگیری می‌کند به طوری که غلظت ۲۲ میکرومولار بعد از ۴۸ ساعت موجب مرگ ۵۰ درصد از سلول‌ها شد. همچنین، موجب القای ۲۳/۳ درصد آپوپتوز اولیه و ۷ درصد آپوپتوز تاخیری در این سلول‌ها شد که این فعالیت با کاهش بیان ژن ضدآپوپتوزی *BCL2* و افزایش بیان ژن پروآپوپتوزی *BAX* انجام شد. در توجیه این که

اشاره کرد (Henninot et al., 2018). با وجود پژوهش‌های گسترده برای یافتن پپتیدهای درمانی علیه سرطان تنها تعداد معدودی دارو به تایید سازمان‌های مربوطه رسیده‌اند که از عمده‌ترین دلایل آن می‌توان به فقدان فراهمی زیستی خوراکی، پایداری ضعیف در گردش خون و حساسیت به تجزیه اسیدی و آنزیمی اشاره کرد. هرچند، تلاش‌ها برای دستیابی به پپتیدهای درمانی موثر همچنان ادامه دارد و به کمک روش‌هایی می‌توان بر این محدودیت‌ها غلبه کرد. آبزیان منبع غنی و مهمی از پپتیدهای زیست‌فعال هستند. از آنجایی که موجودات دریایی در محیط خاصی از نظر شوری، فشار و اکسیژن زندگی می‌کنند، پپتیدهای به دست آمده از منابع دریایی دارای فعالیت‌های زیستی قوی و ساختار خاصی بوده (Zhang et al., 2021) و اهداف جالب توجهی برای کشف پپتیدهای درمانی هستند. در چندین مطالعه اثر پپتیدهای زیست‌فعال بر جلوگیری از تکثیر رده‌های سلولی سرطانی بررسی و تایید شده است (Shaik and Sarbon, 2020; Ahmed et al., 2021). به عنوان مثال، Hsu و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از دو آنزیم پاپائین و پروتئاز XXIII محصول جانبی ماهیچه تیره ماهی تن را هیدرولیز و سپس تخلیص کردند. آنها نشان

که آزمایش آنکسین V بر پایه شمارش تعداد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به وسیله دستگاه فلوسایتومتر است. به علاوه، تعداد سلول‌های استفاده شده در این دو آزمایش نیز متفاوت است. در کل، برای نتیجه‌گیری دقیق درباره مکانیسم اثر این پپتید بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به مطالعات بیشتر بر روی مسیرهای داخلی و خارجی شروع کننده آپوپتوز نیاز است. نتایج حاضر در راستای چند مطالعه دیگر است که خاصیت آپوپتوزی پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین ماهی‌های مختلف را نشان داده‌اند. به عنوان مثال، توالی پپتیدی YALPAH جدا شده از ماهی آنچوی *Setipinna taty* نیم باله (Half-fin Anchovy) می‌تواند از تکثیر سلول‌های PC-3 (رده سلولی سرطان پروستات انسانی) با مقدار IC_{50} برابر با ۸/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جلوگیری کرده و موجب القای آپوپتوز در آنها شود (Song et al., 2014). پپتید شش اسید آمینه‌ای با توالی FIMGPY مشتق شده از هیدرولیز پروتئین غضروف ماهی اسکیت (*Raja porosa*, Skate) فعالیت ضدتکثیری بالایی را علیه سلول‌های سرطانی HeLa با IC_{50} ۴/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد. همچنین، این پپتید می‌تواند با افزایش نسبت

چرا میزان مرگ سلول‌ها در دو آزمایش MTT و آنکسین V مشابه به دست نیامد می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: مطالعات نشان داده‌اند که نتایج به دست آمده از آزمایش MTT تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله تعداد سلول‌های استفاده شده، تراکم سلول‌ها، غلظت MTT، زمان انکوباسیون با MTT، نوع محیط کشت، مقدار سرم در محیط کشت و غیره قرار می‌گیرد و ممکن است موجب شود تا زنده‌مانی سلول‌ها کمتر یا بیشتر از حد واقعی تخمین زده شود (Ghasemi et al., 2021). همچنین، خود MTT هم می‌تواند برای سلول‌ها سمی باشد. متابولیسم داخل سلولی MTT به تدریج باعث آسیب میتوکندری، اختلال در متابولیسم سلولی طبیعی و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌شود. از دست دادن یکپارچگی غشا وابسته به زمان در نتیجه اگزوسیتوز فورمازان نیز به عنوان مکانیسم مرگ سلولی پس از انکوباسیون با MTT پیشنهاد شده است. همچنین، غلظت‌های بالای MTT برای سلول کشنده هستند (Lu et al., 2012; Surin et al., 2017). نکته دیگر، ماهیت متفاوت اندازه‌گیری مرگ سلولی در این دو آزمایش است. آزمایش MTT بر اساس میزان جذب نوری فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده است در حالی

نیز نقش مهمی در برهم‌کنش پپتید با غشا سلول سرطانی دارند. همچنین پرولین در پپتیدها برای برهم‌کنش با غشا سلول و تنظیم انعطاف‌پذیری ساختاری پپتید بسیار مهم است. اسیدهای آمینه گلوتامات و آسپاراتات فعالیت ضدتکثیری بالقوه‌ای بر روی سلول‌های توموری اعمال می‌کنند. همچنین، نشان داده شده است که پپتیدهای حاوی تیروزین، فنیل آلانین یا پرولین می‌توانند فعالیت ضدتکثیری بیشتری داشته باشند. در مجموع، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پپتیدهای ضدسرطان حاوی اسیدهای آمینه کاتیونی و آبگریز، ساختارهای دومی را تشکیل می‌دهند که بر سلول‌های سرطانی تاثیر می‌گذارند (Chiangjong et al., 2020). پپتید مطالعه حاضر حاوی گلیسین، پرولین، گلوتامات و اسیدهای آمینه آبگریز مانند تیروزین و والین است که می‌توانند برای اثرات ضدسرطانی این پپتید تعیین کننده باشند، اما برای روشن شدن این فرضیه نیاز به مطالعات ساختاری و جهش‌زایی هدفمند بر روی توالی این پپتید است.

در مجموع، در مطالعه حاضر نشان داده شد که یک پپتید ساخته شده کوتاه می‌تواند موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطان پستان 4T1 شود. منشا اولیه این پپتید

Bax/Bcl-2 و فعال‌سازی کاسپاز-۳ باعث آپوپتوز شود (Pan et al., 2016). یک پپتید پنج اسید آمینه‌ای با توالی ILYMP از هیدرولیز پروتئین دوکفه‌ای *Cyclina sinensis* جدا شد که این پپتید باعث افزایش بیان *BAX* و کاسپاز-۳ و سرکوب بیان *BCL2* در سلول‌های DU-145 (رده سلولی سرطان پروستات انسانی) می‌شود (Yu et al., 2018). پپتید هضم شده با پروتئاز XXIII مشتق شده از آب پخت ماهی تن با مهار ۳۷/۸ درصد رشد رده سلولی سرطان پستان MCF-7 فعالیت ضدتکثیری شدیدی از خود نشان داد. به علاوه، این پپتید همچنین با کاهش بیان *BCL2*، *PARP*، کاسپاز-۹ و تنظیم بیان *p53* و *BAX* باعث آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 شد (Hung et al., 2014). Lee و همکارانش (۲۰۰۴) گزارش کردند که پپتیدهای جدا شده از ماهی آنچوی با افزایش فعالیت کاسپاز-۳ و کاسپاز-۸ آپوپتوز را در رده سلولی لنفوم انسانی (U937) القا می‌کنند. اثر ضدسرطانی پپتیدها به نوع اسیدهای آمینه، طول توالی، نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، بار خالص، آبگریزی و ساختار دوم آنها بستگی دارد. اسیدهای آمینه رایج در پپتیدهای ضدسرطان عبارت هستند از گلیسین، لیزین و لوسین. اسیدهای آمینه آبگریز

از هیدرولیز محصولات جانبی ماهی تن بوده است که می‌تواند نشان دهنده فواید زیستی و درمانی محصولات جانبی ماهی‌ها باشد. این گونه پپتیدها نه تنها می‌توانند کاندیداهایی برای تولید دارو باشند، بلکه از آنها می‌توان به عنوان مکمل‌های غذایی برای پیشگیری از سرطان استفاده کرد. هرچند، برای رسیدن به این اهداف باید سمیت و اثربخشی آن روی رده‌های سلولی مختلف و همین‌طور در مدل جانوری سرطان مطالعه شود.

منابع

- عزیزی م.، شریفان ا.، حسینی ا. و قوامی ع. ۱۴۰۰. هیدرولیز آنزیمی امعا و احشا ماهی سفید دریای خزر (*Caspian kutum*) و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده. مجله مهندسی بیوسیستم ایران، ۵۲(۳): ۳۷۹-۳۹۰.
- ریعی ث.، رضایی م.، نیکو م. و رفیعیان کوپایی م. ۱۳۹۸. ارزیابی اثرات ضداکسایشی و سیتوتوکسیک پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز آنزیمی و میکروبی عضله ماهی مید *Liza klunzingeri*. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷(۳): ۲۹-۴۹.
- Ahmed S., Mirzaei H., Aschner M., Khan A., Al-Harrasi A. and Khan H. 2021.** Marine peptides in breast cancer: Therapeutic and mechanistic understanding. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 142: 1-12.
- Carneiro B.A. and El-Deiry W.S. 2020.** Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17: 395-417.
- Chiangjong W., Chutipongtanate S. and Hongeng S. 2020.** Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *International Journal of Oncology*, 57(3): 678-696.
- D'Arcy M.S. 2019.** Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43: 582-592.
- Eghtedari M., Jafari Porzani S. and Nowruzi B. 2021.** Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. *Phytochemistry Letters*, 42: 87-103.
- Gao R., Yu Q., Shen Y., Chu Q., Chen G., Fen S. and Sun Q. 2021.** Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 110: 687-699.
- Ghareeb M.A., Tammam M.A., El-Demerdash A. and Atanasov A.G. 2020.** Insights about clinically approved and preclinically investigated marine natural products. *Current Research in Biotechnology*, 2: 88-102.
- Ghasemi M., Turnbull T., Sebastian S. and Kempson I. 2021.** The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23): 1-30.
- Henninot A., Collins J.C. and Nuss J.M. 2018.** The current state of

- peptide drug discovery: Back to the future? *Journal of Medicinal Chemistry*, 61: 1382–1414.
- Hsu K.C., Li-Chan E.C.Y. and Jao C.L. 2011.** Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126(2): 617–622.
- Huang C.Y., Ju D.T., Chang C.F., Muralidhar Reddy P. and Velmurugan B.K. 2017.** A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *BioMedicine (France)*, 7(4): 12–23.
- Hung C.C., Yang Y.H., Kuo P.F., and Hsu K.C. 2014.** Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*, 11: 563–570.
- Kale J., Osterlund E.J. and Andrews D.W. 2018.** BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25: 65–80.
- Lee Y.G., Lee K.W., Kim J.Y., Kim K.H. and Lee H.J. 2004.** Induction of apoptosis in a human lymphoma cell line by hydrophobic peptide fraction separated from anchovy sauce. *BioFactors*, 21(1-4): 63–67.
- Lu L., Zhang L., Wai M.S.M., Yew D.T.W. and Xu J. 2012.** Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*, 26(4): 636–644.
- Nikolaou M., Pavlopoulou A., Georgakilas A.G. and Kyrodimos E. 2018.** The challenge of drug resistance in cancer treatment: A current overview. *Clinical and Experimental Metastasis*, 35(4): 309–318.
- Pan X., Zhao Y.Q., Hu F.Y., Chi C.F. and Wang B. 2016.** Anticancer activity of a hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa cells. *Marine Drugs*, 14(8): 1–11.
- Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G. and Piot J.M. 2006.** Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41(5): 1217–1222.
- Schirmacher V. 2019.** From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2): 407–419.
- Shaik M.I. and Sarbon N.M. 2020.** A review on purification and characterization of anti-

- proliferative peptides derived from fish protein hydrolysate. *Food Reviews International*, 38(7): 1389–1409.
- Song R., Wei R.B., Luo H.Y. and Yang Z.S. 2014.** Isolation and identification of an antiproliferative peptide derived from heated products of peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *Journal of Functional Foods*, 10: 104–111.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. and Bray F. 2021.** Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209–249.
- Surin A.M., Sharipov R.R., Krasil'nikova I.A., Boyarkin D.P., Lisina O.Y., Gorbacheva L.R. and Pinelis V.G. 2017.** Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. *Biochemistry (Moscow)*, 82(6): 737–749.
- You L., Zhao M., Liu R.H. and Regenstein J.M. 2011.** Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14): 7948–7953.
- Yu F., Zhang Y., Ye L., Tang Y., Ding G., Zhang X. and Yang Z. 2018.** A novel anti-proliferative pentapeptide (ILYMP) isolated from *Cyclina sinensis* protein hydrolysate induces apoptosis of DU-145 prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 18: 771–778.
- Zhang Q.T., Liu Z.D., Wang Z., Wang T., Wang N., Wang N. and Zhao Y.F. 2021.** Recent advances in small peptides of marine origin in cancer therapy. *Marine Drugs*, 19(2): 1–29.



Research Paper

Induction of apoptosis in 4T1 breast cancer cell line by a peptide derived from tuna (*Thunnus tonggol*) by-products

Reyhane Chamani^{1*}

DOI: 10.22124/japb.2022.22541.1472

Received: July 2022

Accepted: January 2023

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Chemotherapy drugs have many toxicities and side effects. Therefore, designing effective natural medicines with the least toxicity is very important. Aquatic organisms are a rich source of bioactive compounds including peptides with anti-cancer properties. In studies, it was shown that an 11-amino acid peptide derived from the hydrolysates of dark muscle by-products of tuna (*Thunnus tonggol*) has anticancer properties. In the present study, the effect of this peptide on the viability of 4T1 breast cancer cell line was evaluated using MTT assay and induction of apoptosis in these cells was assessed using flowcytometry and Real-time PCR. The results showed that this peptide inhibited cancer cell viability and induced 30.3% of apoptosis in these cells. The peptide acts through reducing the relative expression of the anti-apoptotic *BCL2* gene and increasing the relative expression of the pro-apoptotic *BAX* gene. Therefore, it can be suggested that this peptide has the potential to be more investigated for therapeutic purposes as well as for supplements with cancer prevention properties.

Key words: *Programmed Cell Death, BCL2, BAX, Anti-cancer.*

1- Assistant Professor in Department of Biology, Yazd University, Yazd, Iran.

*Corresponding Author: chamani@yazd.ac.ir

