مهار بیان Rac1 توسط ملیتین در سلول های سرطان گردن رحم، رده سلولی Hela

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

• دکتر علی مرادی
استادیار بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
morady2008@gmail.com

• ندا عیوضی اروانق
دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
Eivazi_n@yahoo.com

• آرزو چاکرزهی
دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
arezuchakerzehi@yahoo.com

• مهدیه همتی
دانشجوی دکترا بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
student.student1390@yahoo.com

• حمیدرضا شاه مرادی
دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

چکیده

زمینه و هدف بررسی: در ایران، سرطان دهانه رحم پس از سرطان پستان شایع ترین سرطان بوده و پس از سرطان تخمدان دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. مهاجرت سلولی نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک و پاتولوژیک از جمله رشد جنینی، ترمیمی زخم، پاسخ های التهابی، متاستاز تومور و عقب ماندگی ذهنی ایفا می کند. یکی از عوامل تنظیم کننده مهاجرت سلولی، اعضای خانواده Rho GTPase می باشند. Rac1 یکی از اعضای این خانواده می باشد که نقش مهمی در مهاجرت سلولی ایفا می کند. سم زنبور حاوی پپتیدهای فعال بیولوژیک متعددی شامل ملیتین(ترکیب اصلی موجود در سم زنبور)، آپامین، آدولاپین، پپتید دگرانوله کننده ماست سل ها و آنزیم های فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز و همچنین ترکیبات غیر پپتیدی همانند هیستامین، دوپامین و نوراپی نفرین می باشد. ملیتین اثرات ضد متاستازی خود را در سرطان کبد از طریق مهار Rac1 اعمال می کند.

روش بررسی: سلول های hela بعد از رشد و رسیدن به تراکم بیش از ۸۰ درصد، به مدت ۱۲ ساعت با غلظت‌های ۰(به عنوان کنترل)، ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر ملیتین تیمار شدند. پس از جمع آوری ولیزسلول ها با بافر لیز، میزان بیان پروتئین Rac1 در مقایسه با کنترل به روش وسترن بلاتینگ سنجش شد. اطلاعات به دست آمده با کنترل β-Actin مقایسه و به صورت درصد محاسبه گردید.

یافته ها: درصد بیان پروتئین Rac1 در حضور غلظت‌های ۰/۵ (۰/۳٤±۰/۲) و ۱ (۰/۲٤±۰/۱) میکروگرم بر میلی لیتر ملیتین نسبت به کنترل (۱۰۰) کاهش یافته و این کاهش با توجه به ($p<۰/۰۵$) معنی دار می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده نشان داده شد که ملیتین در این مطالعه باعث مهار بیان Rac1 در سلول‌های سرطانی گردن رحم hela می شود.

کلمات کلیدی: ملیتین، Rac1، متاستاز، سرطان گردن رحم

مقدمه

از نظر شیوع، سرطان دهانه رحم در زنان دومین مقام را به خود اختصاص می دهد و عامل اصلی مرگ در کشورهای

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]

در حال توسعه می باشد. در ایران پس از سرطان سینه، سرطان دهانه رحم، شایع ترین سرطان میان زنان بوده و پس از سرطان تخمدان دومین عامل مرگ و میر می باشد(۱).

یکی از مهم ترین داروهای شیمی درمانی که برای درمان این بیماری به کار می رود، سیسپلاتین می باشد. این دارو دارای اثرات سمی متعددی شامل آنمی، نوروپنی تب زا، اثرات گوارشی از جمله تهوع و استفراغ و همچنین اثرات عصبی می باشد. این اثرات نه تنها باعث کاهش کیفیت زندگی می شود بلکه در شرایط خاصی حتی تهدید کننده زندگی هم می باشد (۲).

مهاجرت سلولی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک و پاتولوژیک شامل ترمیم زخم، عقب ماندگی ذهنی، متاستاز تومور، ایجاد آترواسکلروز و آرتریت نقش ایفا می کند (۳). یکی از عوامل تنظیم کننده مهاجرت سلولی، اعضای خانواده Rho GTPase می باشند. Rac1 یکی از اعضای این خانواده می باشد که نقش مهمی در مهاجرت سلولی ایفا می‌کند. این G- پروتئین در سلول های Hela باعث تشکیل برآمدگی های وسیع غشایی در پاسخ به فیبرونکتین شده که در نهایت منجر به القا متاستاز در این سلول ها می گردد (٤).

همچنین طی مطالعات انجام شده مشخص شده است که Rac1 در هسته سلول های اپی تلیال رده سلولی گردن رحم بیان می شود و مهار شیمیایی آن تکثیر این سلول ها را کاهش می دهد (٦).

سم زنبور حاوی پپتیدهای فعال بیولوژیک متعددی شامل ملیتین (ترکیب اصلی موجود در سم زنبور)، آپامین، آدولاپین، پپتید دگرانوله کننده ماست سل ها و آنزیم های فسفولیپاز A_2 و هیالورونیداز و همچنین ترکیبات غیر پپتیدی همانند هیستامین، دوپامین و نوراپی نفرین می باشد (۷). در طول دو دهه اخیر توجه زیادی به سوی سم زنبور و پپتیدهای تشکیل دهنده آن خصوصا ملیتین و خواص ضد سرطانی آن جلب شده است (۸). ملیتین می تواند باعث توقف چرخه سلولی و مهار رشد و همچنین سبب القا آپاپتوز گردد (۸، ۹). ملیتین آنزیم های مختلف از جمله G- پروتئین ها، پروتئین کیناز C، آدنیلات سیکلاز، پروتئین کیناز C و فسفولیپاز D را تحت تاثیر قرار می دهد. ملیتین همچنین دارای نقش انتقال پیام داخل سلولی می باشد. این پپتید به طور مستقیم جابجایی نوکلئوتید به وسیله پروتئین های هتروتریمری متصل به GTP را تحریک می کند. علاوه بر این، ملیتین باعث مهار فعالیت G_s به وسیله کاهش تمایل GTP و GDP به G_s می‌شود (۱۰).

ملیتین اثرات ضد متاستازی خود را در سرطان کبد از طریق مهار Rac1 اعمال می کند (۹).

مواد و روش ها

برای انجام این پژوهش تجربی ملیتین از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. استوک زهر زنبور با غلظت ۱/٦ میلی گرم بر میلی لیتر با آب مقطر استریل تهیه شد.

کشت سلولی: رده سلولی سرطان دهانه رحم hela از انستیتو پاستور ایران تهیه و در فلاسک ۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت (DMEM: Dulbecco ‘s Minimum Essential Medium) غنی شده با ۱۵درصد Fetal Bovin (Serum/Gibco -BRL)، ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین - استرپتومایسین (sigma/آمریکا)، شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیش از ۸۰ درصد (طی مدت ٤۸ ساعت) با توجه به IC_{50} ملیتین که برای مدت زمان ۱۲ ساعت ۱μg/ml می‌باشد (۱۱)، غلظت های برابر و پایین تر از IC50، ۱، ۰/۵ میکروگرم انتخاب و سلول های hela به مدت ۱۲ ساعت تحت تاثیر این غلظت ها تیمار شدند. چون حلال ملیتین آب استریل بود در گروه کنترل به جای ملیتین، آب استریل هم حجم به محیط کشت اضافه شد. برای جداسازی شستشو با بافر فسفات سرد دو مرتبه انجام شد و سپس با استفاده از اسکراپر سلول ها از کف فلاسک جدا شدند. به منظور لیز، سلول‌ها در ۲۵۰ میکرولیتر بافر HES (۲۲۵ میلی مول سوکروز، ٤ میلی مول Na2EDTA، ۲۰ میلی مول HEPES و ۰/۱ میلی مول PMSF و ۱٪ کوکتل آنتی پروتئاز) به خوبی مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ ورتکس شدند. برای جداسازی بقایای سلول های تخریب شده، سلول های لیز شده در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ٦۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی به منظور انجام آزمون های

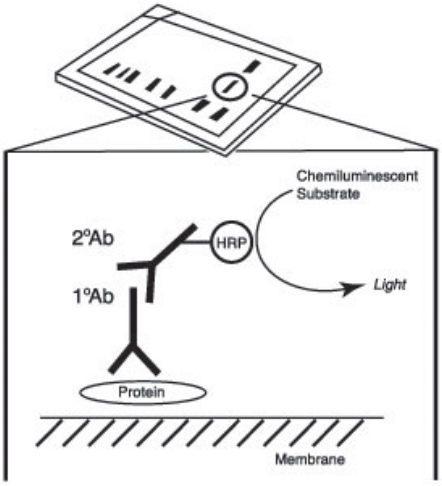
[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]

ایمونوبلاتینگ جدا و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شـــد. پس از آن مقدار پروتئین به روش برادفورد تعیین غلظت شد.

الکتروفورز و ایمونوبلاتینگ: مقدار ۱۰۰ میکرو گرم از نمونه ها روی چاهک هـــای ژل پلی اکریلامید ۱۰٪ (SDS– PAGE) بارگذاری کرده (از هر نمونه داخل دو چاهک مجزا بارگذاری شد، یکی برای رنگ آمیزی و دیگری بـــه منظور انتقال به کاغذ نیتروســـلولز) و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت عمل جداســـازی انجام شد. نیمی از ژل به منظور اطمینان از جدا شدن مناسب پروتئین‌ها توسط رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و نیمی دیگر به کاغذ نیترو ســـلولز انتقال داده شـــد (طی مدت ۱۸ ســـاعت با ولتاژ ثابت ۱۵ ولت). بعد از انتقال، غشـــای نیترو ســـلولز با محلول ۵٪ شیر بدون چربی به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس ازشستشوی کامل با بافر شستشو (TBS/T (Tris Buffer Salin- 0.1%Twin20، غشا با آنتی بادی های اولیه علیه(cell signaling) Rac1 با غلظت ۱:۱۰۰۰

و β-Actin (Santa Cruz Biotecnology / آمریکا) با غلظت ۱:۵۰۰۰ رقیق شـــده در محلول ۵٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) به مدت یک شب دردمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از شستشو، غشا به مدت دو ساعت در دمای محیط با آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP (Horseradish Peroxidase) بـــا غلظـــت ۱:۲۰۰۰ در محلول TBS/T انکوبه شد.

پس از شستشو، باندها به روش کمیلومینسانس تقویت شـــده ECL (GE/Amersham Healthcare انگلستان) و دســـتگاه Gel Documentation عکســـبرداری شـــدند. نتایج به دســـت آمده از تکرار دو بار آزمایش می‌باشـــد و به صورت میانگین ± انحـــراف معیار بیان شـــده است و داده های به دســـت آمده توسط دستگاه Gel documentation and analysis system با استفاده از نرم افزار مخصوص خود دستگاه (Gene tools) آنالیز و داده ها با نرم افزار SPSS نســـخه ١٤ و آزمون آماری one-way anova با فاصله اطمینان ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررســـی و مقایسه، باندهای پروتئیـــن مورد نظر با کنترل داخلـــی β-Actin نرمال شـــدند و سپس هر یک از باند های ۱ ، ۰/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر ملیتین با باند کنترل Rac1 مقایسه و نتایج به صورت درصدی بیان شدند.



بافرهای مورد استفاده در الکتروفورز:

بافر ژل بالا: ٦/١ گرم تریس باز + ٠/٤ گرم SDS + ١٠٠ میلی لیتر آب (PH=6.8)

بافر ژل پایین: ١٨/٢ گرم تریس باز + ٠/٤ گرم SDS + ١٠٠ میلی لیتر آب مقطر (PH=8.8)

بافر الکترود: ٣گرم تریس باز + ١٤/٤ گرم گلیسین + ١ گرم SDS + ١ لیتر آب (PH=8.3)

بافر نمونه (5x): ١٠میلی لیتر بافر ژل بالا + ٥ میلی لیتر گلیســـرول+ ١ گرم SDS + ٠/٢ میلی لیتر محلول برموفنل بلو(٠/٥ درصد حل شـــده در اتانول) + ١ میلی لیتر ٢- مرکاپتواتانول را مخلوط کرده و حجم نهایی را به ٢٠ میلی لیتر می رسانیم.

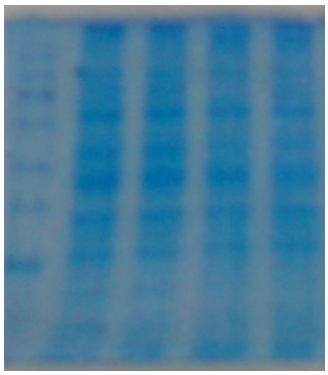
بافـــر انتقال (مرحله بلاتینگ): ٣ گـــرم تریس باز+ ١٤/٤ گرم گلیســـین را در ٥٠٠ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و ســـپس ١٥٠ میلی لیتـــر متانول افزوده و حجم نهایی را با آب مقطر به ١ لیتر می رسانیم.

نتایج

الکتروفورز: مقدار ١٠٠ میکرو گرم از نمونه های لیز

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]

شـــده با بافر لیز، روی ژل پلی اکریلامید ۱۰٪ برده شد بـــرای اطمینان از لیز نمونه ها و بررســـی باندها بعد از الکتروفورز ژل مورد نظر با کماسی بلو رنگ آمیزی شده و سپس با محلول رنگ بر رنگبری انجام شد.



۰/۵ ۱μg/ml کنترل مارکرپروتئین

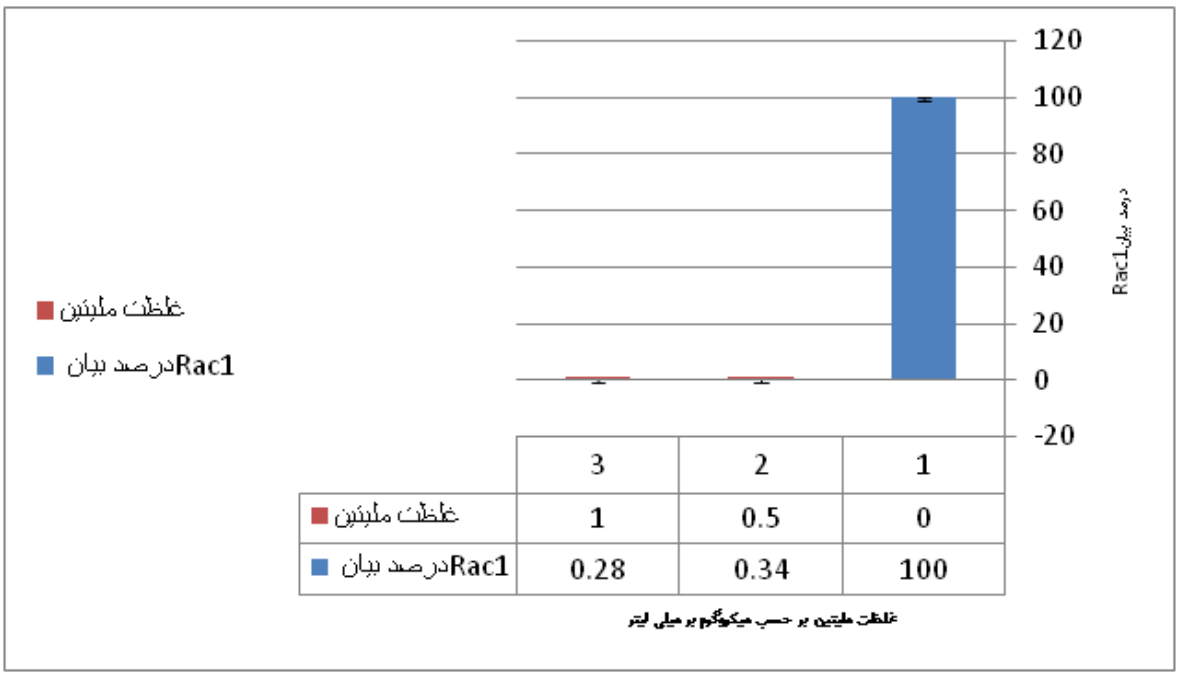
شکل ۱: بررسی الگوی نمونه لیز شده سلول های Hela با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۰٪ (SDS-PAGE)

تاثیر ملیتین بر میزان بیان پروتئین Rac1 به روش وسترن بلات

همانطور که در نمودار زیر آمده است یافته های به دست آمـــده از تاثیر ملیتین روی میزان بیان پروتئین Rac1 نشـــان داد که تیمار ســـلول ها با غلظت های ۰/۵ و ۱ میکرو گرم بر میلی لیتر ملیتین و کنترل به مدت ۱۲ ســـاعت تاثیر قابل توجهی بر روی میزان بیان پروتئین Rac1 دارد و باعث مهار بیان این پروتئین می شـــود. در هر ســـه غلظت بیان Rac1 نســـبت به کنترل کاهش داشـــته و این تفاوت ها معنی دار می باشند. ($p < ۰/۰۵$).

غلظت ملیتین ۰(کنترل) ۰/۵ ۱

شکل ۲: باندهای حاصل از وسترن بلاتینگ Rac1 در غلظت های مختلف ملیتین (میکرو گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با کنترل بتا اکتین



نمودار ۱: تاثیر غلظت های مختلف ملیتین (بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر) بر میزان بیان پروتئین Rac1 بر حسب درصد

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]

بحث

با توجه به اثرات جانبی روش های شیمیایی درمان سرطان، نظر محققان به استفاده از ترکیبات طبیعی که خواص ضد سرطانی و ضد متاستازی دارند، جلب شده است. در این مطالعه به بررسی اثر ملیتین به عنوان یک ترکیب طبیعی مشتق شده از سم زنبور عسل بر میزان بیان پروتئین Rac1 پرداخته شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده اثر مهاری قابل توجه ملیتین، در یک روش وابسته به غلظت بر میزان بیان پروتئین Rac1 می باشد.

مطالعه ای که بر روی سلول های سرطانی کبد، رده HCC و اثر ملیتین بر متاستاز این سلول ها صورت گرفته است، نشان دهنده این مطلب می باشد که ملیتین باعث کاهش متاستاز این سلول ها در شرایط in vivo و in vitro از طریق مهار بیان Rac1 می شود. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر مهار بیان Rac1 توسط ملیتین، علیرغم تفاوت در رده سلولی، همگام و موافق می باشد و با توجه به اهمیت Rac1 در پیشرفت سرطان و متاستاز، نتایج این دو تحقیق در کنار هم می تواند اهمیت استفاده از ملیتین را در کنار سایر داروها به منظور بهبود سیر درمانی بیماری سرطان، روشن سازد (۹).

نظر به این که Rac1 در هسته سلول های سرطانی گردن رحم بیان می شود و مهار شیمیائی آن تکثیر این سلول ها را کاهش می دهد و با توجه به این که نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده مهار بیان Rac1 در این سلول ها توسط ملیتین می‌باشد، می توان از اثرات پیشگیری کننده از سرطان این ترکیب طبیعی در سرطان دهانه رحم بهره برد(٦).

شواهد رو به رشدی وجود دارد که نشان دهنده دخالت خانواده Rho-GTPase در مراحل مختلف ایجاد و پیشرفت سرطان شامل ترانسفورماسیون سلولی، بقاء، تهاجم، متاستاز و آنژیوژنز می باشد (۱۲). افزایش بیان Rac1،RhoA و Cdc42 با سرطان زایی و پیشرفت تومورهای متعدد انسانی مرتبط است (۱۲).

طی مطالعه ای که در سال ۲۰۰٤ بر روی سرطان بیضه صورت گرفته، مشخص شده است که بیان ROCK،RhoA و Rac1 در بافت توموری بیضه بیشتر از بیان آن در بافت طبیعی بیضه می باشد. این شواهد نشان دهنده این مطلب می‌باشد که احتمالا خانواده Rho GTPase در سرطان زایی و مهاجرت سلول های توموری بیضه، رده GCT نقش قابل توجهی ایفا می کند (۱۳).

افزایش تعداد چسبندگی های موضعی در سلول با افزایش تهاجم آن مرتبط است. فعال شدن Rac منجر به پلیمریزاسیون اکتین و تشکیل lamellipodia می شود، که این امر خود منجر به افزایش چسبندگی های موضعی می شود. تشکیل چسبندگی های موضعی نیز به نوبه خود باعث فعال شدن Rac می شود که یک حلقه پس نورد مثبت را ایجاد می کند. هنگامی که این حلقه از تنظیم خارج شود، تحرک و تهاجم سلول افزایش می یابد. این نظریه بیان کننده این مطلب است که افزایش فعالیت Rac در واریانت های متاستاتیک سلولی افزایش می یابد (١٤).

مطالعه حاضر نشان دهنده اثر مهاری ملیتین بر میزان بیان Rac1 در سلول های سرطانی گردن رحم می‌باشد. لذا در صورت تایید این نتایج توسط مطالعات جانوری و انسانی می توان از پتانسیل درمانی این ماده بهره برد.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]

References

1- Karimi Zarchi M, Akhavan A, Fallahzadeh H, Gholami H, Dehghani A, Teimoori S.Outcome of cervical cancer in Iranian patients according to tumor histology, stage of disease and therapy. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2010;11(5):1289-91. Epub 2011/01/05.

2- Keskar V, Mohanty PS, Gemeinhart EJ, Gemeinhart RA. Cervical cancer treatment with a locally insertable controlled release delivery system. Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. 2006;1. 8-280: (3) 15. Epub 2006/10/13.

3- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. Science. 2003;302(5651):1704-9.

4- Katoh H, Hiramoto K, Negishi M. Activation of Rac1 byRhoG regulates cell migration. Journal of Cell Science. 2006;119(1):56-65.

5- DESHPANDE SS, ANGKEOW P, HUANG J, OZAKI M, IRANI K. Rac1 inhibits TNF-α-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. The FASEB Journal. 2000;1. 14-1705: (12) 4.

6- Mendoza-Catalán MA, Cristóbal-Mondragón GR, Adame-Gómez J, del Valle-Flores HN, Coppe JF, Sierra-López L, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. BMC cancer. 2012;12(1):116.

7- Habermann E. Bee and wasp venoms. Science. 1972;177(4046):314-22.

8- Ling C, Li B, Zhang C, Gu W, Li S, Huang X, et al. [Anti-hepatocarcinoma effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene]. Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing zazhi= Chinese journal of hepatology. 2004;12(12):741-4.

9- Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. Hepatology. 2008;47(6):1964-73.

10- Oršolić N. Bee venomin cancer therapy. Cancer and Metastasis Reviews. 2012:1-22.

11- Zarinnahad H, Mahmoodzadeh A, Pooshang Bagheri K, Mahdavi M, Shahbazzadeh D, Moradi A. Isolation of Melittin from Iranian Honey Bee Venom and Investigation of Its Effect on Proliferation ofCervical Cancer-HeLa Cell Line. SSU_Journals. 2013;21(2):226-38.

12- Sahai E, Marshall CJ. RHO–GTPases and cancer. Nature Reviews Cancer. 2002;2(2):133-42.

13- Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. Clinical cancer research. 2004;10(14):4799-805.

14- Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2005;7(6):R965-74.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2024-06-16]