مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره هفت، مهر ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۱۲/۱۸

تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل توسط توکسین منفذساز فراگاسئاتوکسین C در رده‌سلولی سرطان پستان MCF-7

محمدحسن خیراندیش[۱]، حسین زارعی‌جلیانی*[۱و۲]، مهدی ایمانی[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: شیمی‌درمانی به‌دلیل عوارض جانبی دوز بالای استفاده در درمان بسیاری از بیماری‌ها با محدودیت‌های زیادی مواجه است. در این تحقیق با استفاده از توکسین منفذساز فراگاسئاتوکسین C (FraC) که به صورت نوترکیب در باکتری تولید شده است، تسهیل ورود داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل بر رده‌سلولی سرطان پستان MCF-7 مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه ژن توکسین FraC از منبع تجاری، ژن با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده NcoI و XhoI، وارد وکتور بیانی pET28a شد. بیان توکسین در باکتری اشریشیا کلی به‌وسیله IPTG القا شد و توکسین به‌وسیله روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص شد. پس از بررسی فعالیت همولیز توکسین به‌وسیله روش توربیدومتری، اثرات سیتوتوکسیک و تقویت اثر داروی ۵-فلورویوراسیل به‌وسیله سنجش تریپان‌بلو و تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل داده‌ها به‌وسیله تست T-student و نرم‌افزار SPSS Inc Vession v16 در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

نتایج: توکسین FraC در باکتری اشریشیا کلی به صورت نوترکیب تولید شده و به‌صورت خالص با خلوص نسبی حدود ۸۶ درصد تهیه شد. اثرات سیتوتوکسیک این توکسین بر روی رده‌سلولی MCF-7 وابسته به دوز و زمان تیمار است. مقدار IC_{50} برای توکسین برابر ۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در دوزهای غیرکشنده، این توکسین باعث تقویت اثر ۴ تا ۶ برابری داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل در زمان‌های مختلف (۲۴ تا ۷۲ ساعت) می‌شود.

نتیجه‌گیری: تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل با تسهیل ورود این دارو به سلول‌های سرطان پستان MCF-7 توسط توکسین منفذساز FraC می‌تواند از عوارض شیمی‌درمانی این دارو بکاهد.

واژه‌های کلیدی: توکسین منفذساز، پروتئین نوترکیب، فراگاسئاتوکسین C، سرطان پستان

ارجاع: خیراندیش محمد حسن، زارعی جلیانی حسین، ایمانی مهدی. **تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل توسط توکسین منفذساز فراگاسئاتوکسین C در رده‌سلولی سرطان پستان MCF-7**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۷): ۴۶-۱۷۳۵.

۱- دانشجوی دکتری، آزمایشگاه مهندسی پروتئین، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران
۲-استادیار، مرکز تحقیقات زیست‌فناوری، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران
۳-دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۳۷۲۴۰۱۷۱، پست الکترونیکی: zarei.j@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۶۹۷۸۴۷۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

مقدمه

درمان‌های بیولوژیک سرطان در طی چند دهه اخیر در حوزه تحقیقات به‌خوبی مورد توجه قرار گرفته‌اند و اخیراً بعضی از آن‌ها وارد فازهای آزمون‌های بالینی شده‌اند (۱،۲،۳). در بین درمان‌های بیولوژیک، توکسین‌ها مدت‌هاست که در تحقیقات بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. برای بسیاری از بیماری‌ها به‌ویژه سرطان‌ها، لازم است تا توکسین‌ها بتوانند بین سلول‌های بیمار و سلول‌های سالم تفکیک قائل شوند. روش‌های شیمی‌درمانی مرسوم که هنوز هم یکی از راه‌های علاج بیماران سرطانی هستند قادر به این تمیز دادن نیستند (۱،۴،۵).

توکسین‌های منفذساز (PFTs) توسط انواع مختلفی از موجودات زنده به‌صورت پروتئین‌های محلول در آب ترشح می‌شوند. اما به‌محض اینکه به‌هدف خود رسیدند، تغییر ماهیت داده و به پروتئین‌های غشایی تبدیل می‌شوند و با ایجاد منفذ در غشاهای بیولوژیک، سلول هدف را از بین می‌برند (۶،۷،۸). گزارش شده است که مسیرهای آپوپتوز و به‌ویژه کاسپاز-۲ نیز در اثر این توکسین‌ها در سلول‌های هدف فعال می‌شوند (۹،۱۰). این توکسین‌ها غالباً براساس ویژگی‌های ساختاری به دوگروه α-PFTs و β-PFTs طبقه‌بندی می‌شوند. گروه α-PFTs با استفاده از آلفا هلیکس ایجاد منفذ می‌کنند. از توکسین‌های این گروه می‌توان به انواع کولیسین‌ها، همولیزین E اشریشیا کلی و اِکینوتوکسین‌ها اشاره کرد. توکسین‌های β-PFTs در ساختار خود غنی از صفحات بتا هستند. به‌عنوان مثال از اعضای این گروه می‌توان به α-توکسین کلستریدیوم سپتیکوم، α- همولیزین استافیلوکوک اورئوس و توکسین محافظتی آنتراکس اشاره کرد. هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است که چگونه توکسین‌ها به درون غشای سلولی وارد می‌شوند، اما پیشنهاد شده است که اعضای هر گروه احتمالاً از مکانیسم یکسانی تبعیت می‌کنند (۱۱،۱۲). توکسین فراگاسئاتوکسین C که در این طرح مورد استفاده قرار گرفته است، از خانواده آلفا است و سوراخ‌های کوچکتری با حدود ۷ تا ۱۰ زیرواحد در غشاهای بیولوژیک ایجاد می‌کند. این سوراخ‌ها برای عبور مولکول‌های کوچکی تا نهایت اندازه داروی‌شیمیایی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. اما درمورد خانواده بتا که می‌توان به گروه توکسین‌های CDC (Cholesterol-dependent cytolysin) اشاره کرد، با دارا بودن حدود ۳۰ تا ۵۰ زیرواحد پروتئینی، سوراخ‌های بزرگتری را در غشا ایجاد می‌کنند که برای ورود مولکول‌های بزرگ‌تر و حتی ژن هم می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. با مقدمه‌ای که بیان شد، در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از یک توکسین منفذساز نوترکیب به نام فراگاسئاتوکسین C که در حدود یک‌دهه از شناسایی ساختمان سه‌بعدی پروتئین آن می‌گذرد (۱۳)، برای تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل در سلول‌های سرطان سینه استفاده شود.

روش بررسی

کلونینگ مولکولی

ژن توکسین FraC از یک منبع تجاری تهیه شد. ژن که در وکتور تجاری pUC57 تحویل داده شده بود به وسیله واکنش PCR با پرایمرهای یونیورسال وکتور pUC57 تکثیر شد. محصول PCR کلین‌آپ شده به‌همراه وکتور تجاری pET28a که در باکتری *E. coli* تکثیر شده است، در یک واکنش آنزیمی به‌وسیله آنزیم‌های محدودکننده NcoI و XhoI (تهیه شده از شرکت Fermentas) دایجست آنزیمی شدند. هر دو محصول دایجست آنزیمی به‌وسیله رسوب اتانول کلین‌آپ شدند و در یک واکنش لیگاز توسط آنزیم T4 لیگاز (شرکت سیناکلون) به‌هم متصل شدند.

بیان پروتئین نوترکیب

پلاسمید حاصل از مرحله قبل، به‌ترتیب در دو باکتری DH5α و سپس BL21 (DE3) که به‌وسیله روش شیمیایی کلسیم‌کلرید مستعد شده بودند، کلون شدند. کلونی‌های باکتری BL21 (DE3) در محیط‌کشت LB دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار القاکننده IPTG به مدت ۴ ساعت کشت داده شدند.

استخراج و تخلیص پروتئین

پلت حاصل از باکتری‌های القا شده پس از جمع‌آوری در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر لیز (تریس ۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۸، نمک

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار، گلیسرول ۱۰٪ و ۲-مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار) در دستگاه سونیکاتور به‌مدت ۳۰ ثانیه با شدت ۶۰ درصد (با ۱۰ تکرار) برروی یخ سونیکه شد. سوپ محلول حاصل از لیز این باکتری‌ها برروی ستون میل ترکیبی Ni-NTA (رزین محصول شرکت کیاژن) عبور داده شد. بافر شستشوی ستون مشابه با بافر لیز با این تفاوت که حاوی ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول بود و بافر Elution نیز شبیه به‌همین بافرها محتوی ایمیدازول ۳۰۰ میلی‌مولار بود. بافر دیالیز پس از خارج شدن فرکشن‌ها و تشخیص باند پروتئین خالص در SDS-PAGE، بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با نمک NaCl ۵۰ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰٪ با pH معادل ۸ بود. پروتئین خالص‌شده در فرکشن‌های ۱۵۰ میکرولیتری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

سنجش همولیز

مقدار ۲ تا ۳ میلی‌لیتر خون تازه فرد سالم تهیه شد و با حجم برابر از بافر فسفات‌سالین نرمال شستشو انجام شد، تا زمانی که مایع رویی شفاف گردید. سپس رقیق‌سازی تا رسیدن OD به حدود ۱/۵ انجام شد. رقت‌های مختلف از توکسین در بافر فسفات‌سالین نرمال تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از هرکدام با ۵۰۰ میکرولیتر از خون رقیق شده فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. میزان درصد همولیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Hemolysis}\ (\%)= (A_{max} - A_{test})/(A_{max} - A_{min}) *100$$

با این توضیح که A_{max} بالاترین جذب مشاهده شده برای محلول RBC دست‌نخورده در هر سنجش و A_{min} میزان جذب همان محلول RBC در مجاورت بالاترین غلظت توکسین پس از زمان ۲ ساعت است. پارامتر A_{test} میزان جذب هر نمونه است که پس از زمان انکوباسیون هر سنجش در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

تعیین غلظت پروتئین

سنجش غلظت پروتئین به‌وسیله روش برادفورد با استفاده از پروتئین استاندارد BSA، معرف برادفورد (تهیه شده از کوماسی‌بلو G250) و خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد.

کشت سلول MCF-7

رده‌سلولی سرطان پستان MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط‌کشت RPMI 1640 در حضور ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین/ استرپتومایسین) در انکوباتور CO_2 کشت داده شدند. درصد حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان‌بلو سنجش گردید.

سنجش MTT

سنجش MTT برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک توکسین FraC و هم‌چنین داروی ۵-فلوروپیوراسیل برروی سلول MCF-7 مورد استفاده قرار گرفت. به‌طور خلاصه سلول‌ها در یک پلیت ۹۶ حفره در غلظت ۱۰ هزار سلول در هر چاهک در حضور غلظت‌های مختلف داروی ۵-فلوروپیوراسیل و یا توکسین FraC کشت داده شدند. بعد از گذشت زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن دارو یا توکسین یا ترکیبی از آن‌ها، ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شد. جذب پلیت در دستگاه الایزا ریدر با استفاده از فیلتر ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. منحنی دوز-پاسخ براساس میزان بقای سلول‌ها در هر چاهک برحسب درصد رسم شد و با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶، مقدار IC_{50} در هر زمان محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام نتایج در سه تکرار بدست آمدند و معنادار بودن تفاوت نتایج از نظر آماری بوسیله تست T-student و نرم‌افزار SPSS Inc Version v16 محاسبه گردید. مقدار p value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معیار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است.

نتایج

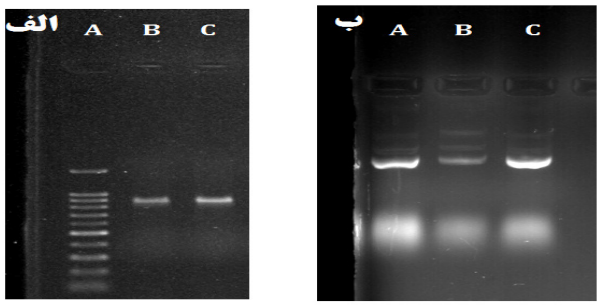
کلونینگ ژن FraC

برای کلون کردن ژن FraC، جایگاه‌های آنزیم‌های محدودکننده NcoI و XhoI از قبل در دو انتهای ژن FraC

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

اضافه شده بودند، لذا در محصول نهایی با سایز حدود ۹۰۰ جفت‌باز جایگاه‌های آنزیم‌های محدودکننده نیز وجود دارد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد برده شد که نتیجه آن در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌شود. در ادامه، قطعه جدا شده از محصول PCR دابل‌دایجست شده، با وکتور pET28a دابل‌دایجست شده با آنزیم‌های مشابه، در یک واکنش آنزیم لیگازی انکوبه شد و در باکتری مستعد شده DH5α کلون گردید. شکل ۱ (ب) نشان‌دهنده تخلیص پلاسمید با روش دستی و رسوب ایزوپروپانول است که از سه کلونی باکتری ترانسفورم شده DH5α تخلیص شده است. کلونی‌های حاصل از ترانسفورم باکتری DH5α در روز بعد کشت داده شدند و با روش دستی، پلاسمید موجود در آن‌ها تخلیص شد.



شکل ۱: مراحل کلونینگ ژن توکسین FraC.

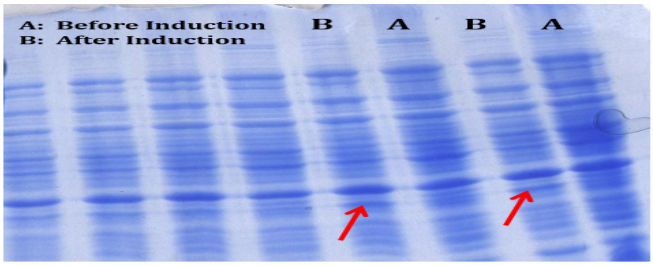
بخش الف: ژل آگاروز ۱/۲ درصد که در آن محصول PCR ژن فراگاسئاتوکسین C بارگذاری شده است. قطعه ژن توکسین تکثیر شده در سایز حدود ۹۰۰ جفت‌باز در چاهک‌های ۲ و ۳ مشخص است. بخش ب: نشان‌دهنده پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از کلونی‌های مختلف باکتری DH5α است.

القای بیان پروتئین نوترکیب FraC

کلونی‌های باکتری BL21 حاوی وکتور بیانی pET28a-FraC در محیط‌کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و با افزودن IPTG به غلظت ۱۰۰ میکرومولار و گذشتن زمان حداقل ۳ ساعت، پلت باکتری‌ها جمع‌آوری شده و در یک ژل SDS-PAGE، محتوای پروتئینی باکتری حاوی وکتور بیانی، قبل و بعد از القای بیان پروتئین باهم مقایسه شدند (شکل ۲).

تخلیص پروتئین FraC

یکی از کلونی‌های باکتری حاوی وکتور بیانی، پس از کشت شبانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط حاوی کانامایسین، با سانتریفیوژ جمع‌آوری شد و پس از انجام سونیکاسیون، از ستون کروماتوگرافی رزین نیکل Ni-NTA عبور داده شد. شکل ۳ نمونه تخلیص شده را نشان می‌دهد.

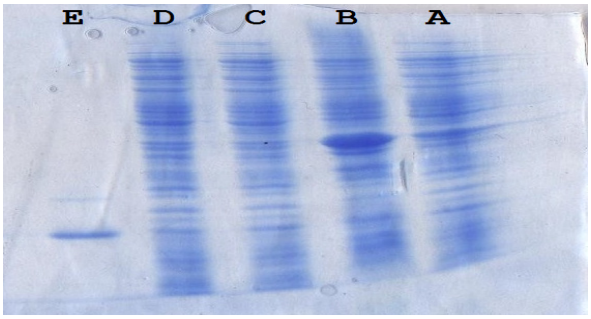


شکل ۲: القای بیان پروتئین نوترکیب FraC.

شکل، ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۵٪ محتوای پروتئینی کلونی‌های مختلف باکتری BL21 (DE3) حاوی وکتور بیانی، قبل و بعد از القا توسط IPTG را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

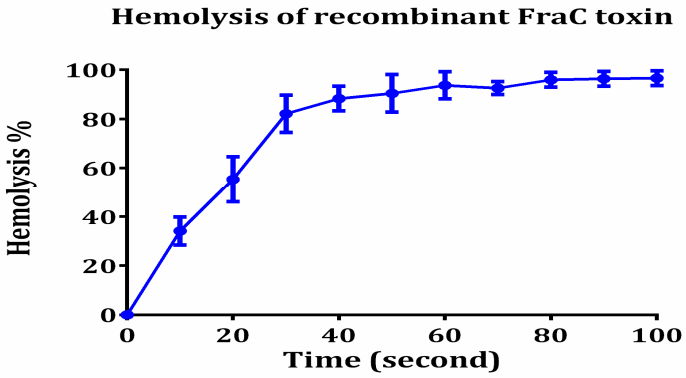


شکل ۳: تخلیص پروتئین FraC به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی.

ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۵٪ از نمونه‌های تخلیص پروتئین در شکل نشان داده شده است. نمونه‌های A و B قبل و بعد از القا، نمونه C سوپ حاصل از لیز باکتری، نمونه D فلوترو (Flowthrough) عبوری از ستون و نمونه E نشان‌دهنده فرکشن تخلیص شده از ستون است.

فعالیت همولیز توکسین FraC

پس از تخلیص توکسین نوترکیب، انجام دیالیز و همچنین تعیین غلظت پروتئین به‌روش برادفورد، فعالیت همولیز توکسین FraC در یک سنجش همولیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این سنجش گلبول قرمز انسانی رقت سازی شد و اثر غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از توکسین‌ها بر آن مورد سنجش قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، توکسین با یک روند وابسته به زمان باعث لیز گلبول قرمز می شود. در این مطالعه برچسب هیستیدینی به‌منظور تخلیص پروتئین، در سمت پایانه کربوکسیل به ژن توکسین متصل شده است. به‌نظر می‌رسد که این کار اثر مهاری بر فعالیت بیولوژیک توکسین نداشته است.



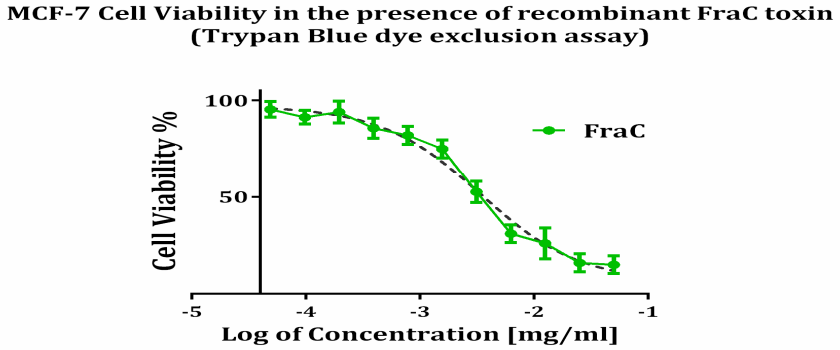
شکل ۴: فعالیت همولیز توکسین نوترکیب FraC.

تغییرات OD نمونه گلبول قرمز در سنجش همولیز (طول موج ۶۰۰ نانومتر) برحسب زمان ثبت شد و با تبدیل مقادیر OD به درصد همولیز در شکل نشان داده شده است.

میزان زنده مانی سلول MCF-7 در حضور توکسین نوترکیب FraC

سلول‌های MCF-7 در محیط RPMI کشت داده شدند و در حضور غلظت‌های مختلف و افزاینده توکسین FraC به‌مدت انکوباسیون ۱۵ دقیقه در یک سنجش تریپان‌بلو مورد آزمون قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است، به‌طور وابسته به دوز، توکسین FraC باعث نفوذپذیری سلول به رنگ تریپان‌بلو می‌گردد. مقدار IC_{50} برای توکسین با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism برابر ۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. بنابراین می‌توان با استفاده از نتایج سنجش تریپان‌بلو نتیجه گرفت که توکسین FraC قابلیت اتصال و نفوذ به غشای سلول‌های MCF-7 و نفوذپذیر کردن این سلول‌ها به رنگ تریپان‌بلو را به خوبی دارا است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]



شکل ۵: بقای سلول MCF-7 در حضور توکسین FraC در سنجش تریپان‌بلو.

میزان زنده ماندنی سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف توکسین نوترکیب FraC در سنجش تریپان‌بلو محاسبه گردید.

تقویت اثر (Potentiation) داروی شیمی‌درمانی 5FU در رده‌سلولی MCF-7

برای بررسی تقویت اثر (Potentiation) داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل در رده‌سلولی MCF-7، غلظت‌های غیرکشنده توکسین FraC نوترکیب (۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) بر سلول MCF-7 به‌مدت ۵ دقیقه مجاور شد و سپس غلظت‌های مختلف ۵-فلورویوراسیل بر سلول اثر داده شد. این آزمایش با داروی ۵-فلورویوراسیل بدون حضور توکسین به‌طور هم‌زمان و در یک پلیت تکرار شد. برای توکسین نوترکیب نیز هم‌زمان کنترل منفی قرار داده شد تا مطمئن شویم که در این غلظت هیچگونه سمیتی مشاهده نمی‌شود. همان‌طور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری از اثر داروی ۵-فلورویوراسیل بر سلول‌ها در حضور و عدم حضور توکسین نوترکیب مشاهده می‌شود. مقادیر IC_{50} که با نرم‌افزار Graphpad بدست آمده است در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. همان‌طور که مشخص است، غلظت‌های غیرکشنده توکسین نوترکیب FraC باعث افزایش ۴ تا ۶ برابری اثرات کشندگی داروی ۵-فلورویوراسیل در زمان‌های مختلف اثر بر روی سلول MCF-7 شده‌اند.

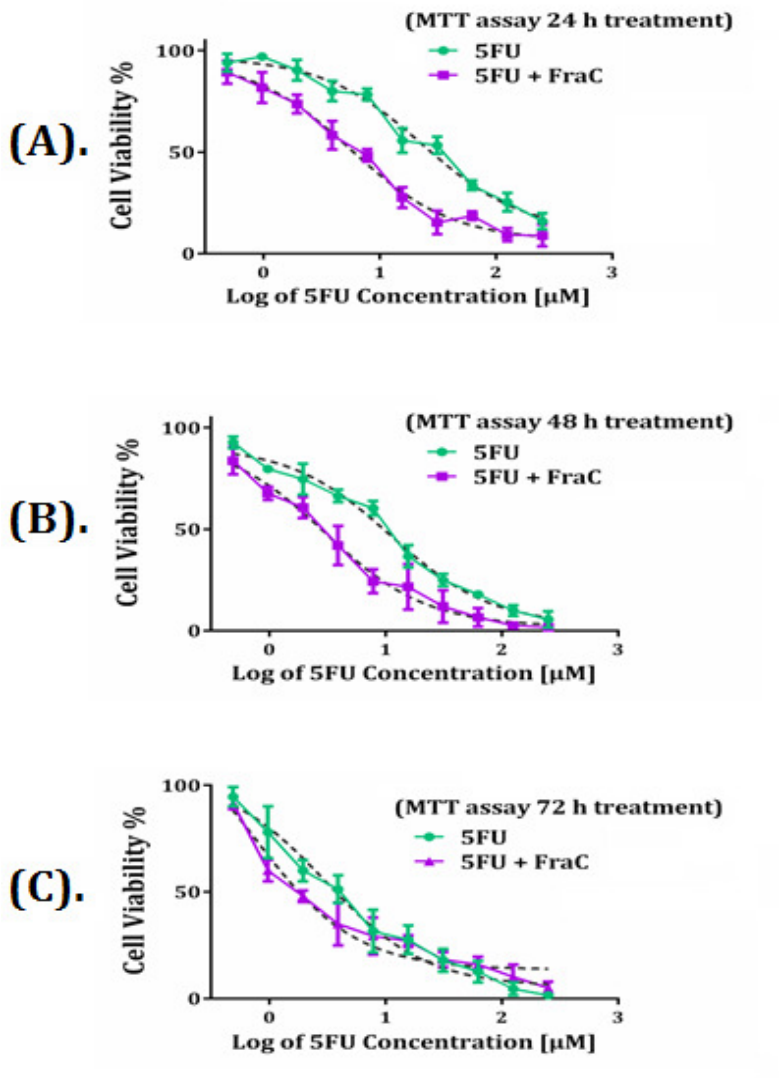
جدول ۱: مقادیر IC_{50} به‌دست آمده در سنجش MTT . واحدها برحسب میکرومولار غلظت 5FU هستند.

IC_{50} Values	5FU	5FU + FraC
24 h MTT assay	23.38±1.21	5.64±0.27
48 h MTT assay	11.12±0.78	3.03±0.18
72 h MTT assay	3.04±0.26	0.75±0.14

مقادیر IC_{50} به‌دست آمده در تست رنگ سنجی MTT پس از انکوباسیون سلول MCF-7 با داروی ۵-فلورویوراسیل و یا ترکیب این دارو و توکسین FraC در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با $p \leq ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار بود. نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار (Mean±SD) حاصل از آنالیز t test سه بار تکرار نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]



شکل ۶: بقای سلول MCF-7 در حضور توکسین FraC توسط سنجش MTT.

سلول‌های MCF-7 در مجاورت غلظت غیرکشنده ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر توکسین FraC نوترکیب و سپس غلظت های مختلف داروی 5FU قرار گرفته‌اند و درصد زنده‌مانی آن‌ها در طی زمان‌های ۲۴ (A)، ۴۸ (B) و ۷۲ (C) ساعت توسط تست MTT محاسبه گردید که هرکدام به‌صورت مجزا نشان داده شده‌اند.

بحث

درمان سرطان با چالش‌های عمده‌ای از جمله عدم اختصاصیت کافی روش‌های درمانی مواجه است. به‌طور گسترده‌ای مشاهده شده است که شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی عوارض قابل‌توجهی ایجاد می‌کنند. هدف‌گیری غیراختصاصی و سمیت سلول‌های خودی اثربخشی درمان را محدود می‌کنند. بنابراین تلاش‌های تحقیقاتی اخیر روی درمان سرطان به‌وسیله مولکول‌های بیولوژیک به‌خصوص آنتی‌بادی‌ها و پپتیدهای هدفیاب و هم‌چنین سایر عوامل اختصاصی‌کننده از قبیل آپتامرها متمرکز شده است (۱،۲،۳،۴،۵،۱۴). در این تحقیق، ژن توکسین FraC مشتق از شقایق دریایی *Actinia fragacea* که در سال ۲۰۰۹ برای اولین‌بار ساختمان پروتئینی آن تعیین شده است، سنتز شد و طی مراحلی در وکتور بیانی pET28a کلون شد. پس از بیان پروتئین نوترکیب FraC در باکتری *E. coli* و تخلیص پروتئین نوترکیب، اثرات همولیتیک و سیتوتوکسیک آن و هم‌چنین تقویت اثر آن برروی داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در بخش نتایج مشخص است، در این مطالعه این

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

پروتئین به‌صورت نوترکیب به‌خوبی بیان و تخلیص شد. با این که تعداد کمی از تحقیقات در مورد مهندسی توکسین‌های منفذساز منتشر شده است، اما می‌توان دریافت که پایانه آمین توکسین‌های خانواده اکتینوپورین‌ها که از توکسین‌های منفذساز آلفا به‌شمار می‌روند برای عملکرد آن‌ها بسیار ضروری است (۱۵،۱۶). به‌همین دلیل، توکسین در این مطالعه به گونه‌ای تولید شد که برچسب هیستیدین برای تخلیص پروتئین در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار بگیرد.

نتایج به‌دست آمده از سنجش فعالیت همولیتیک توکسین نوترکیب FraC، مطابق با مشاهدات انجام شده در مطالعه بلومیو و همکاران ایشان بود. طی مطالعه‌ای که این گروه انجام داد، توکسین FraC به صورت نوترکیب (از باکتری *E. coli*) و طبیعی (مستقیماً از شقایق توت فرنگی) تخلیص شد و اثر همولیتیک آن‌ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که این توکسین در هر دو حالت دارای فعالیت همولیتیک تقریباً یکسانی است و این فعالیت به غلظت پروتئین وابسته است (۱۷). هم‌چنین در این مطالعه نشان داده شد که برای فعالیت هر دو پروتئین، یک غلظت ۰/۸ نانومولار به‌عنوان حد آستانه وجود دارد که پایین‌تر از آن همولیز انجام نمی‌شود و در غلظت ۵۰ نانومولار میزان همولیز برای هر دو پروتئین به ۱۰۰ درصد می‌رسد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که توکسین نوترکیب تخلیص‌شده FraC در این طرح در غلظت‌های بالاتر فعالیت همولیتیک بالاتری نشان می‌دهد و در غلظت تقریباً معادل با غلظت مطالعات قبلی فعالیت آن به حداکثر می‌رسد (۱۷،۱۸،۱۹). میزان IC_{50}، غلظتی که در آن ۵۰ درصد از اریتروسیت ها لیز می‌شوند، در مطالعه ما برابر ۹ نانومولار و در مطالعه بلومیو برای توکسین نوترکیب ۶/۵ نانومولار گزارش شد. به‌نظر می‌رسد که فعالیت بیولوژیک توکسین نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* که در این تحقیق تولید شده است با توکسینی که از منبع طبیعی آن استخراج شده است، نزدیک است. سنجش تریپان‌بلو برای توکسین‌های منفذساز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، هرچند که برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک خانواده‌های پروتئینی دیگر و هم‌چنین داروهای شیمیایی کوچک‌مولکول، سنجش‌های دیگر از قبیل MTT، XTT مؤثرتر نشان می‌دهند. توکسین‌های منفذساز باعث نفوذپذیر شدن غشای سلولی می‌شوند و با از دست‌رفتن تعادل آب و الکترولیت‌ها در دو طرف غشای پلاسمایی، سلول‌ها مرگ برنامه‌ریزی شده را تجربه می‌کنند. برای بررسی اثرات توکسین‌های منفذساز بر سلول‌های هدف هیچ سنجشی بهتر از تریپان‌بلو نمی‌توان استفاده کرد، چراکه دقیقاً سازوکار اصلی عملکرد این توکسین‌ها بر سلول نیز همان است که در سنجش تریپان‌بلو مورد بررسی قرار می‌گیرد. همان‌طور که در مطالعات سایر محققین نیز آمده است، سلول‌های تحت‌تاثیر توکسین‌های منفذساز، هنگامی که آسیب می‌بینند، در همان دقایق اولیه سریعاً در سنجش تریپان‌بلو این آسیب را نشان می‌دهند. حتی زمانی که در سنجش تریپان‌بلو سلول‌ها رنگ می‌گیرند، ممکن است در صورت پایین بودن غلظت توکسین و ترمیم غشای خود، بتوانند زنده بمانند و تریپان‌بلوی وارد شده به سیتوپلاسم خود را به بیرون پمپ کنند (۲۰،۲۱). به بیان دیگر مرگ سلولی گزارش شده در سنجش تریپان‌بلو با مرگ گزارش شده در سنجش‌های دیگر متفاوت است. بنابراین بهترین سنجش برای بررسی اثر توکسین‌های منفذساز بر غشای سلولی سنجش تریپان‌بلو است. در این سنجش همان‌طور که در بخش نتایج (شکل ۵) آمده است، توکسین FraC با اتصال اولیه به مولکول اسفنگومیلین موجود در غشای پلاسمایی سلول هدف، در آن درج می‌شود و سلول در سنجش تریپان‌بلو به‌سرعت رنگ می‌گیرد. اتصال اولیه اسفنگومیلین به توکسین FraC برای درج‌شدن در غشا الزامی است (۲۲،۲۳).

در این تحقیق، اثرات داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروپوراسیل در حضور غلظت‌های غیرکشنده FraC نیز مورد بررسی قرارگرفت. همان‌طور که در نتایج مشخص شد، توکسین نوترکیب FraC در غلظت‌هایی که فاقد اثرات کشندگی بود باعث تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروپوراسیل شد. در مطالعه‌ای با طراحی مشابه که توسط سولتی و همکاران انجام شد، غلظت‌های غیرکشنده‌ای از توکسین Bc2 و اِکیناتوکسین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

II توانست اثرات داروهای شیمی‌درمانی سیتوزین آرابینوزید، دوکسوروبیسین و وین‌کریستین را تقویت کند (۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که توسط غلامی و همکاران انجام شد، اثرات سینرژیسم توکسین اپسیلون با داروی شیمی‌درمانی متوترکسات در رده‌های سلولی سرطان‌های ریه و پستان مورد بررسی قرارگرفت. در این تحقیق نیز غلظت‌های بسیار پایین و غیرکشنده توکسین باعث تقویت اثر داروی متوترکسات گردید. در صورت بهبود دسترسی داروهای شیمی‌درمانی به‌داخل سلول‌های سرطانی، می‌توان دوزهای موثر این داروها را بهبود بخشید. این امر می‌تواند عوارض جانبی و محدودیت دوز استفاده از این داروها را تا حدود زیادی رفع نماید. یکی از روش‌های این بهبود، استفاده از عوامل هدف گیرنده‌ای نظیر آنتی‌بادی‌ها و پپتیدهای هدفیاب است (۲۵،۲۶). استراتژی دیگر بهبود عبور داروها از خلال غشاهای بیولوژیک است که در این زمینه، روش‌ها و ابزارهای مختلف فیزیکی و شیمیایی و نانوسامانه‌ها در تحقیقات درحال بررسی هستند (۲۷،۲۸). توکسین‌های منفذساز نیز می‌توانند در این زمینه بیشتر مورد بررسی قرار بگیرند. شاید در آینده، یکی از مزایای این توکسین‌ها نسبت به روش‌های دیگر، بیولوژیک بودن آن‌ها باشد که باعث می‌شود تا بتوان آن‌ها را با یکنواختی بیشتر و هزینه کمتری تولید نمود. هم‌چنین مهندسی توکسین‌ها برای هدف‌گیری اختصاصی آن‌ها با کمک آنتی‌بادی‌ها و سایر عوامل در آینده می‌توانند دسترسی ورود داروهای شیمی‌درمانی به سلول‌های سرطانی را بیش از پیش تسهیل نمایند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، مشخص شد که تقویت اثر داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورویوراسیل با تسهیل ورود این دارو به سلول‌های سرطانی MCF-7 توسط توکسین فراگاسئاتوکسین C می‌تواند از عوارض شیمی‌درمانی آن بکاهد. به‌نظر می‌رسد در صورتی که بتوان با مهندسی پروتئین اثرات کشنده توکسین‌های منفذساز را از سلول‌های طبیعی حذف کرد، می‌توان از این توکسین‌ها به‌عنوان یک تقویت‌کننده اثر داروهای شیمی‌درمانی در درمان سرطان‌های مختلف استفاده کرد.

سپاس‌گزاری

ضمن تقدیر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به‌خاطر پشتیبانی و حمایت مالی از این تحقیق، اعلام می‌دارد که این مقاله بر اساس قسمتی از داده‌های به‌دست آمده از طرح تحقیقاتی با کد ۴۰۲۰ در مرکز تحقیقات زیست‌فناوری دانشگاه نوشته شده است.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. ***Cancer Immunotherapy.*** Biotechnol J 2006; 1(2): 138-47.

2-Wong HH, Lemoine NR. ***Biological Approaches to Therapy of Pancreatic Cancer.*** Pancreatology 2008; 8(4-5): 431-61.

3-Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. ***Cancer Immunotherapy Comes of Age.*** J clin oncol 2011; 29(36): 4828-36.

4-Wong L, Suh DY, Frankel AE. ***Toxin Conjugate Therapy of Cancer.*** Semin Oncol 2005; 32(6): 591-5.

5-Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. ***Immunotoxin Therapy of Cancer.*** Nat Rev Cancer 2006; 6(7): 559-65.

6-Geny B, Popoff MR. ***Bacterial Protein Toxins and Lipids: Pore Formation or Toxin Entry Into Cells.*** Biol Cell 2006; 98(11): 667-78.

7-Yamashita D, Sugawara T, Takeshita M, Kaneko J, Kamio Y, Tanaka I, et al. ***Molecular Basis of Transmembrane Beta-Barrel Formation of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

Staphylococcal Pore-Forming Toxins. Nat Commun 2014; 5: 4897.

8-Tilley SJ, Saibil HR. ***The Mechanism of Pore Formation by Bacterial Toxins.*** Curr Opin Struct Biol 2006; 16(2): 230-6.

9-Imre G, Rajalingam K. ***Role For Caspase-2 During Pore-Forming Toxin-Mediated Apoptosis.*** Cell Cycle 2012; 11(20): 3709-10.

10-Gonzalez-Juarbe N, Bradley KM, Riegler AN, Reyes LF, Brissac T, Park SS, et al. ***Bacterial Pore-Forming Toxins Promote the Activation of Caspases in Parallel to Necroptosis to Enhance Alarmin Release And Inflammation During Pneumonia.*** Sci Rep 2018; 8(1): 5846.

11-Cirauqui N, Abriata LA, van der Goot FG, Dal Peraro M. ***Structural, Physicochemical and Dynamic Features Conserved Within the Aerolysin Pore-Forming Toxin Family***. Sci Rep 2017; 7(1): 13932.

12-Menestrina G, Serra MD, Prevost G. ***Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family***. Toxicon 2001; 39(11): 1661-72.

13-Mechaly AE, Bellomio A, Morante K, Gonzalez-Manas JM, Guerin DM. ***Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Fragaceatoxin C, A Pore-Forming Toxin From The Sea Anemone Actinia Fragacea.*** Acta Crystallogr Sect F, Struct Biol Cryst Commun 2009; 65(Pt 4): 357-60.

14-Zhou G, Wilson G, Hebbard L, Duan W, Liddle C, George J, et al. ***Aptamers: A Promising Chemical Antibody for Cancer Therapy.*** Oncotarget 2016; 7(12): 13446-63.

15-Tanaka K, Caaveiro JM, Morante K, Gonzalez-Manas JM, Tsumoto K. ***Structural Basis for Self-Assembly of A Cytolytic Pore Lined By Protein and Lipid.*** Nat Commun 2015; 6: 6337.

16-Mechaly AE, Bellomio A, Gil-Carton D, Morante K, Valle M, Gonzalez-Manas JM, et al. ***Structural Insights Into the Oligomerization and Architecture of Eukaryotic Membrane Pore-Forming Toxins.*** Structure 2011; 19(2): 181-91.

17-Bellomio A, Morante K, Barlic A, Gutierrez-Aguirre I, Viguera AR, Gonzalez-Manas JM. ***Purification, Cloning And Characterization of Fragaceatoxin C, A Novel Actinoporin from the Sea Anemone Actinia Fragacea***. Toxicon 2009; 54(6): 869-80.

18-Azadpour M, Karimian M, Kheirandish MH, Asadi-Saghandi A, Imani M, Astani A, et al.***Evaluating Cytotoxic Effects of Recombinant Fragaceatoxin C Pore Forming Toxin Against AML Cell Lines.*** IranJ Basic Med Sci 2018; 21(9): 878-83.

19-Imani M, Jaliani HZ, Kheirandish MH, Azadpour M. ***Recombinant Production and Affinity Purification of the Frac Pore Forming Toxin Using Hexa-His Tag and Pet Expression Cassette.*** Iran J Basic Med Sci 2017; 20(4): 380-5.

20-Thelestam M, Mollby R. ***Survival of Cultured Cells after Functional and Structural Disorganization of Plasma Membrane by Bacterial Haemolysins and Phospholipases.*** Toxicon 1983; 21(6): 805-15.

21-Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N.***Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated With The Pore-Forming Toxin Hlyii of Bacillus Cereus.*** Plos One 2011; 6(9): e22876.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

22-Rojko N, Dalla Serra M, Macek P, Anderluh G. ***Pore Formation by Actinoporins, Cytolysins from Sea Anemones.*** Biochim Biophys Acta 2016; 1858(3): 446-56.

23-Garcia-Linares S, Palacios-Ortega J, Yasuda T, Astrand M, Gavilanes JG, Martinez-del-Pozo A, et al. ***Toxin-Induced Pore Formation Is Hindered by Intermolecular Hydrogen Bonding in Sphingomyelin Bilayers.*** Biochim Biophys Acta 2016; 1858(6):1189-95.

24-Soletti RC, de Faria GP, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, et al. ***Potentiation of Anticancer-Drug Cytotoxicity by Sea Anemone Pore-Forming Proteins in Human Glioblastoma Cells***. Anti-cancer drugs 2008; 19(5): 517-25.

25-Chari RV, Miller ML, Widdison WC. ***Antibody-Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy.*** Angew Chem Int Ed Engl 2014; 53(15): 3796-827.

26-Mukherjee A, Waters AK, Babic I, Nurmemmedov E, Glassy MC, Kesari S, et al. ***Antibody Drug Conjugates: Progress, Pitfalls, and Promises***. Hum Antibodies 2019; 27(1): 53-62.

27-Patel TR. ***Nanocarrier-Based Therapies for CNS Tumors.*** CNS oncol 2014; 3(2): 115-22.

28-Sawyer AJ, Piepmeier JM, Saltzman WM. ***New Methods for Direct Delivery of Chemotherapy for Treating Brain Tumors.*** Yale J Biol Med 2006; 79(3-4): 141-52.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO7 | Oct 2019

Received: 30 Jan 2019
Accepted: 9 Mar 2019

Potentiation Effect Of 5FU by Fragaceatoxin C Pore-Forming Toxin in MCF-7 Cell Line

Mohammad Hassan Kheirandish[1], Hossein Zarei Jaliani[†1, 2], Mehdi Imani[3]

Original Article

Introduction: Chemotherapy has been restricted due to the high-dose side effects. In the present study, acceleration of the chemotherapeutic drug (5FU) entrance into MCF-7 cells has been explored by using a recombinant form of Fragaceatoxin C (FraC) pore-forming toxin.

Methods: In this experimental study, the gene for FraC toxin was order from a commercial source and was sub-cloned into pET28a vector using NcoI and XhoI restriction enzymes. Expression of the protein was induced by IPTG and purification was performed using Ni-NTA affinity chromatography. Hemolysis was tested using a turbidimetric assay. Cytotoxic and potentiation effects of the recombinant toxin on 5FU chemotherapeutic drug were analyzed using trypan blue and MTT assays. T-student test was used to analyze the data using the SPSS v16 software. Significance was defined as $P \leq 0.05$

Results: Recombinant FraC toxin was produced in *E. coli* with 86% purity. Cytotoxic effects of the FraC toxin in MCF-7 cells were dose and time-dependent. the IC50 of FraC toxin on MCF-7 cells was 3.3 mg/ml. Non-toxic concentrations of recombinant FraC toxin enhanced cytotoxic effects of 5FU by a factor of 4 to 6 in different exposure times (24-72 h).

Conclusion: Potentiation of the 5FU chemotherapeutic effect by acceleration of its entrance into cancer target cells using FraC pore-forming toxin can reduce its side effects of the chemotherapy.

Keywords: Pore-forming toxin, Recombinant protein, Fragaceatoxin C, Breast cancer

Citation: Kheirandish MH, Zarei Jaliani H, Imani M. **Potentiation effect of 5FU by fragaceatoxin C pore-forming toxin in MCF-7 cell line.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(7): 1735-46.

[1]Protein Engineering Laboratory, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

[2]Biotechnology Research Center, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

[3]Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

***Corresponding author: Tel:** 03537240171, **email:** hzarei@ssu.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i7.1933]