مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۳
صفحه: ۱۰۰۹-۱۰۰۱

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 2, May-Jun 2014
Pages: 1001-1009

بررسی اثر ملیتین بر میزان بیان پروتئین Rac1 به عنوان مارکر متاستاز در سلول‌های سرطان معده رده AGS

مهدیه همتی[۱]، ندا عیوضی[۲]، آرزو چاکرزهی[۳]، علی مرادی*[۴]، جواد محیطی اردکانی[۵]، امیر محمودزاده[۶]

۱،۲،۳،۶- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۴- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۵- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۸

چکیده

مقدمه: شناخت مکانیسم‌های مولکولی در متاستاز برای طراحی و استفاده مؤثر از استراتژی‌های درمانی جدید ضروری می‌باشد. یک دسته از مولکول‌هایی که در این مکانیسم نقش دارند Rac1 است. با توجه به عوارض جانبی روش‌های درمانی رایج مانند شیمی درمانی، امروزه توجه زیادی به ترکیبات طبیعی شده است که دارای اثرات جانبی کمتر و خواص ضدسرطانی هستند. ملیتین یک پپتید آمفی پاتیک مشتق شده از سم زنبور عسل می‌باشد. مطالعات نشان دادند که ملیتین با تأثیر بر میزان بیان Rac1 نقش مهمی در کاهش متاستاز سلول‌های سرطانی دارد. در این مطالعه به بررسی تأثیر ملیتین بر میزان بیان پروتئین Rac1 در سلول‌های سرطان معده رده AGS پرداخته شده است.

روش بررسی: سلول‌های AGS بعد از رشد و رسیدن به تراکم بیش از ۸۰ درصد، به مدت ۶ ساعت با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملیتین تیمار شدند. پس از جمع‌آوری و لیز سلول‌ها با بافر لیز، میزان بیان پروتئین Rac1 در مقایسه با کنترل به روش وسترن بلاتینگ سنجیده شد. اطلاعات به دست آمده با کنترل β-Actin مقایسه و به صورت درصد محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون Anova One-Way تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: بیان پروتئین Rac1 در حضور غلظت‌های ۰/۲ (۵/۵±۱۰۹) و ۰/۳ (۳/۶±۱۰۵) ملیتین نسبت به کنترل (۱۰۰) افزایش و غلظت ۰/۴ (۲±۱۰۰) شبیه به کنترل شد که تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p>0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده ملیتین در این مطالعه تأثیری بر بیان Rac1 در سلول‌های سرطانی معده رده AGS ندارد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، ملیتین، Rac1، متاستاز

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۱-۷۲۱۶۰۲۲، پست الکترونیکی: student.student1390@yahoo.com

- این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

در مقایسه با سایر سرطان‌ها، سرطان معده دومین علت اصلی مرگ و میر حاصل از سرطان و چهارمین سرطان شایع در جهان محسوب می‌گردد(۱،۲). پیشرفت‌هایی در زمینه تشخیص و درمان در جهت حیات طولانی با تشخیص اولیه سرطان پیشنهاد شده است. در حالی که شیوع عوارض سرطان معده و مرگ ناشی از آن با متاستاز همراه می‌باشد(۳). متاستاز شامل گسترش سلول‌های توموری از تومور اولیه به محل‌های دیگر در بدن می‌باشد(۴). که یک فرایند چندمرحله‌ای است و همراه با اختلال در مسیرهای سیگنالینگ شامل مسیرهای مرتبط با چسبندگی و تحرک سلول می‌باشد(۵). بیان پروتئین‌های خانواده Rho تنظیم‌کننده‌های اصلی پیش‌روندگی سلول و متاستاز می‌باشند و از دسته GTPasesها می‌باشند(۶). Rac1 عضوی از این گروه بوده که در بازسازی اسکلت سلولی و کنترل رشد سلول نقش دارد(۷). در فرایند متاستاز Rac-1 باعث تشکیل lamellipodia از طریق سازماندهی اسکلت سلولی (اکتین) و رشد میکروتوبول‌ها می‌شود(۸). مطالعات نشان داده که میزان بیان Rac-1 در سلول‌های سرطان معده افزایش می‌یابد که باعث افزایش متاستاز در سرطان معده می‌گردد(۹). ملیتین یک پپتید کوچک و آمفی پاتیک و جزء اصلی مشتق شده از سم زنبور Apis Mellifera است که دارای ۲۶ ریشه آمینواسیدی می‌باشد و دارای یک ناحیه N-ترمینال هیدروفوب (۲۰-۱ اسیدآمینه) و یک ناحیه C-ترمینال هیدروفیل (۲۶- ۲۱ اسیدآمینه) با بار مثبت می‌باشد(۱۰). ملیتین با تداخل در برهم‌کنش لیپیدپروتئین در غشای سلول اختلال ایجاد می‌کند و لیز سلولی را موجب می‌شود(۱۱). با پیشرفت مکانیسم‌های مؤثرتر برای تحویل ملیتین به درون سلول‌های خاص از قبیل نانوذرات، ملیتین به عنوان هدف بزرگی برای درمان سرطان می‌باشد(۱۲). در سرطان کبد ملیتین با کاهش حرکت و مهاجرت سلول‌ها به وسیله مهار فعالیت Rac-1 از متاستاز جلوگیری می‌کند(۱۳). مطالعات کمی در زمینه تأثیر ملیتین روی Rac-1 و متاستاز صورت گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ملیتین بر روی میزان بیان پروتئین Rac-1 در سرطان معده رده سلولی AGS در مقایسه با گروه کنترل است.

روش بررسی

برای انجام این پژوهش تجربی ماده ملیتین به صورت خالص و تجاری از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد. ملیتین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا – فاز معکوس (RP-HPLC) و با استفاده از ستون C18 از زهر زنبورعسل استخراج گردید و تجزیه و تحلیل فراکشن ملیتین با استفاده از SDS-PAGE خالص بودن آن را تأیید شد(۱۴). استوک زهر زنبور با غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با آب مقطر استریل تهیه شد.

رده سلولی سرطان معده AGS از انستیتو پاستور ایران تهیه و در فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت (DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium) غنی شده با ۱۵ درصد (Gibco -BRL) FBS Fetal Bovin Serum)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین(سیگما-آمریکا)، شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. با توجه به غلظت مهارکنندگی رشد ۵۰ درصد سلول‌ها (IC50) ملیتین برای مدت زمان ۶ ساعت، ۱/۲ µg/ml می‌باشد(۱۴) غلظت‌های پایین‌تر از IC50، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ میکروگرم انتخاب شد و سلول‌های AGS بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیش از ۸۰ درصد به مدت ۶ ساعت که زمان لازم برای مسیرهای سیگنالینگ و بیان پروتئین‌ها می‌باشد، تحت تأثیر این غلظت‌ها تیمار شدند. با توجه به اثرات سمی ملیتین و اینکه ملیتین باعث تخریب سلول‌ها می‌شود، باید غلظت‌هایی انتخاب شود که بیش از نیمی از سلول‌ها زنده بمانند. چون حلال ملیتین، آب استریل بود در گروه کنترل آب استریل هم حجم به جای ملیتین به محیط کشت اضافه شد. جهت جداسازی، شستشو با بافر فسفات سرد دو مرتبه انجام شد و سپس با استفاده از اسکراپر سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. به منظور لیز، سلول‌ها در بافر HES (۲۲۵ میلی‌مول سوکروز، ۴ میلی‌مول Na2EDTA، ۲۰ میلی‌مول HEPES و ۱ میلی‌مول PMSF و ۱٪ کوکتل آنتی‌پروتئاز) به خوبی مخلوط و به مدت

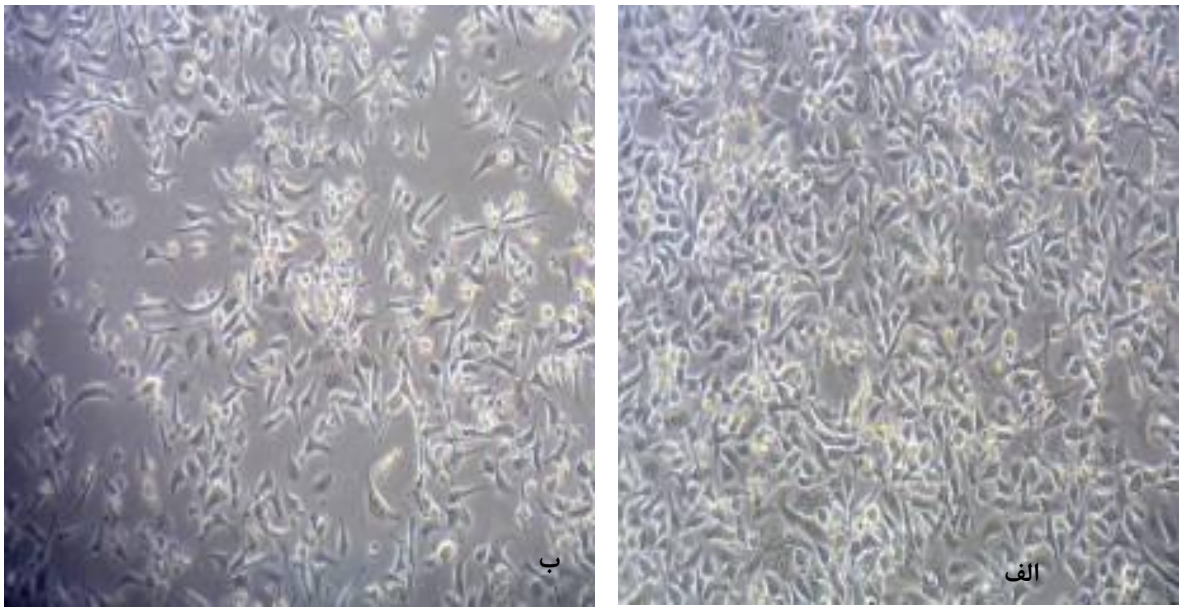
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و سپس ورتکس شدند. برای جداسازی بقایای سلول‌های تخریب شده، سلول‌های لیز شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰g سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی به منظور انجام آزمون‌های ایمونوبلاتینگ جدا و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن مقدار پروتئین به روش برادفورد تعیین غلظت شد.

جهت الکتروفورز و ایمونوبلاتینگ، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از نمونه‌ها روی ژل پلی اکریلامید ۱۰٪(SDS–PAGE) بارگذاری شد و با ولتاژ ثابت ۸۰ میلی‌ولت عمل جداسازی انجام گردید و سپس به کاغذ نیترو سلولز انتقال داده شدند. بعد از انتقال، غشای نیتروسلولز با محلول ۵٪ شیر بدون چربی به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس از شستشوی کامل با بافر شستشوT BS/T (Tris Buffer Salin- 0.1%Twin20)، غشا با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه Rac1 (Cell signaling) با غلظت ۱:۱۰۰۰ و β-Actin (Santa Cruz Biotecnology–آمریکا) با غلظت ۱:۵۰۰۰ رقیق شده در محلول ۵٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو، غشا به مدت دو ساعت در دمای محیط با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده باHRP: Horseradish Peroxidase با غلظت ۱:۲۰۰۰ در محلول TBS/T انکوبه شد. پس از شستشو، باندها به روش کمی لومینسانس تقویت شده ECL (GE/Amersham Healthcare-انگلستان) و دستگاه Gel Documentation عکسبرداری شدند. نتایج به دست آمده از تکرار سه بار آزمایش به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و داده‌های به دست آمده توسط دستگاه Gel documentation and analysis system با استفاده از نرم‌افزار مخصوص خود دستگاه (Gene tools) تجزیه و تحلیل و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ و آزمون آماری Anova One-Way مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی و مقایسه، باندهای پروتئین موردنظر با کنترل داخلی β-Actin نرمال شدند و سپس هر یک از باندهای۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملیتین با باند کنترل Rac1 مقایسه و نتایج به صورت درصدی بیان شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

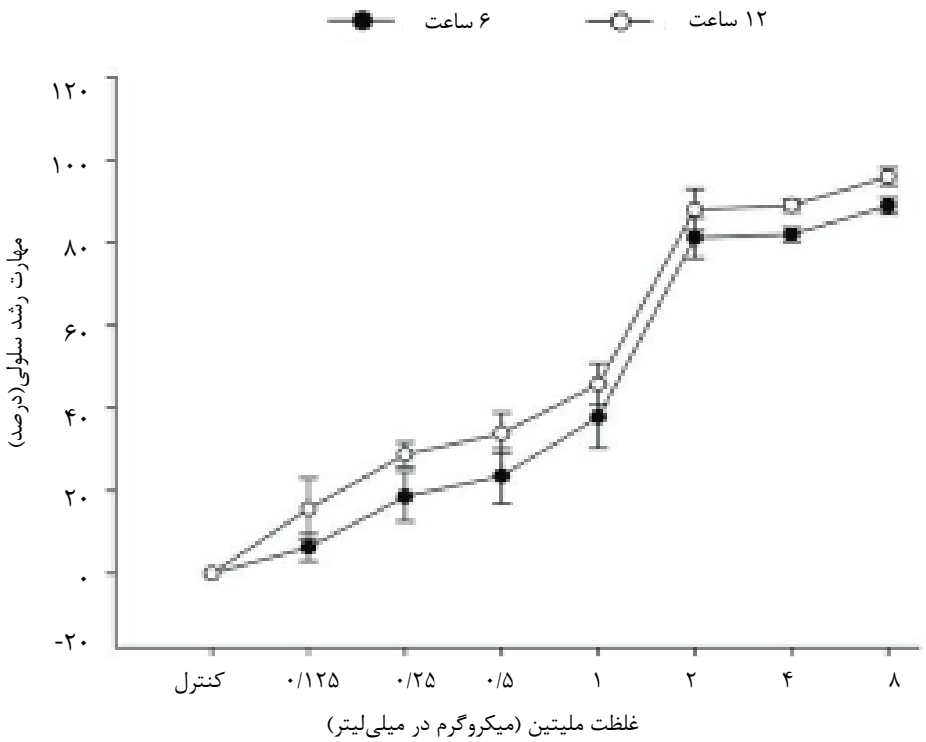
نتایج

سلول‌های AGS بعد از رشد و رسیدن به تراکم ۸۰٪ با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ ملیتین با توجه به IC50 (نمودار ۱) به مدت ۶ ساعت تیمار شدند. سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با ملیتین با میکروسکوپ معکوس بررسی گردیدند (شکل ۱ الف و ب).



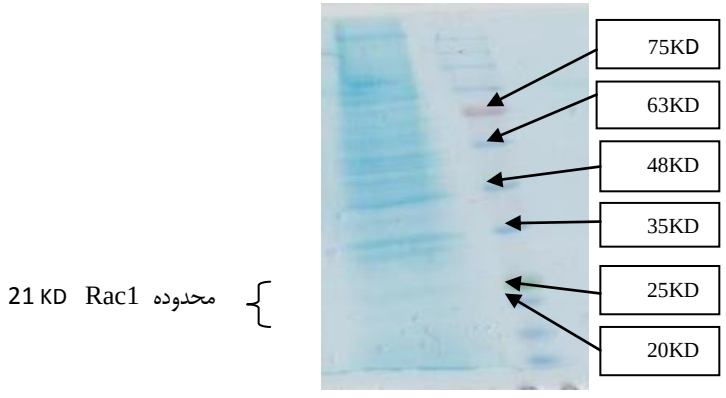
شکل ۱: عکس‌های میکروسکوپی از کشت سلول AGS
الف) قبل از تیمار با ملیتین- ب) بعد از تیمار با ملیتین در غلظت ۰/۴

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار۱: اثر غلظت‌های مختلف ملیتین بر رشد سلول‌های سرطانی معده AGS

مقدار ۱۰۰ میکروگرم از نمونه‌های لیز شده با بافر لیز، روی ژل پلی اکریلامید ۱۰٪ برده شد برای اطمینان از لیز نمونه‌ها و بررسی باندها بعد از الکتروفورز ژل مورد نظر با کماسی بلو رنگ‌آمیزی شده و سپس با محلول رنگ بر رنگبری انجام شد (شکل ۲).

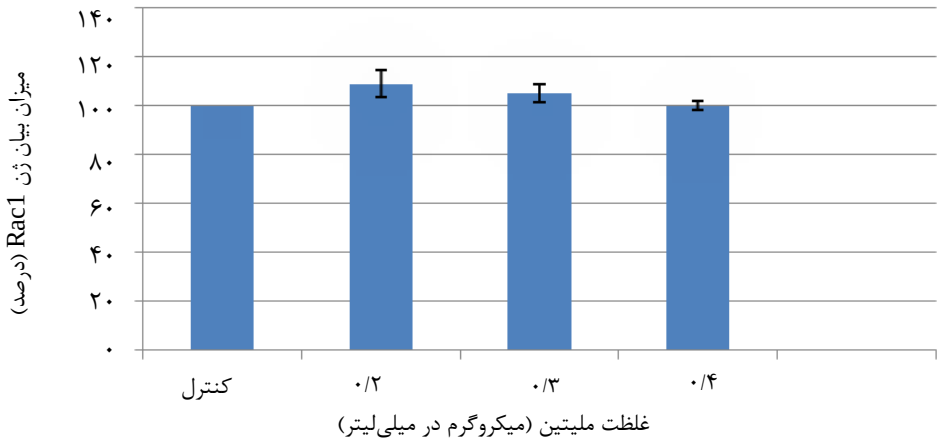


شکل ۲.بررسی الگوی نمونه لیز شده سلول‌های AGS با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۰٪ (SDS-PAGE). M (Marker) و S (Lysis sample)

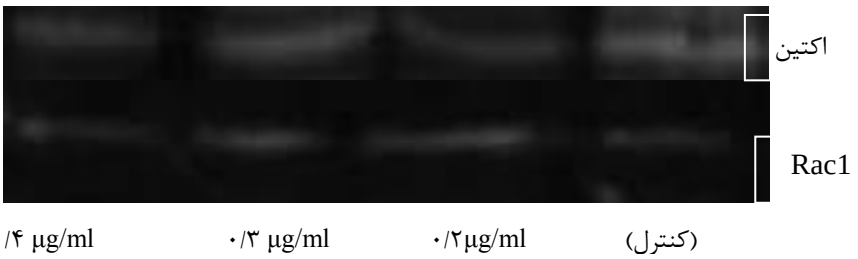
همانطور که در نمودار ۲ آمده است یافته‌های به دست آمده از تأثیر ملیتین روی میزان بیان پروتئین Rac1 نشان داد که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۲ ،۰/۳، ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملیتین و کنترل به مدت ۶ ساعت تأثیری روی میزان

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بیان پروتئین Rac1 ندارد. نتایج حاصل از آزمون آماری Anova One-Way نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد و برای غلظت‌های۰/۲ و ۰/۳ نسبت به کنترل افزایش و غلظت ۰/۴مشابه کنترل بوده که اختلافات معنی‌دار نبودند (p>۰/۰۵) (نمودار ۲، شکل ۳).



نمودار۲: تأثیر غلظت‌های متفاوت ملیتین بر میزان بیان پروتئین Rac1 برای زمان ۶ ساعت



شکل ۳: باندهای حاصل از وسترن بلاتینگ Rac1 در غلظت‌های مختلف ملیتین در مقایسه با کنترل بتا اکتین

بحث و نتیجه گیری

علیرغم پیشرفت‌های موجود در زمینه جراحی و شیمی درمانی، سرطان معده مشکل عمده سلامت جهانی می‌باشد(۱۵). متاستاز سلول‌های سرطانی به عنوان بزرگترین مانع در درمان سرطان مطرح است(۱۶). امروزه ترکیبات طبیعی که خواص ضدسرطانی و آنتی متاستازی دارند با این رویکرد که روش‌های درمانی مدرن اثرات جانبی دارند، توجه محققان را به خود جلب نموده است. ملیتین به عنوان یک ترکیب طبیعی مشتق شده از سم زنبور عسل می‌باشد و تحقیقات نشان داده‌اند ملیتین با مهار VEGFR-2 و مسیرهای سیگنالینگ MAPK، فعالیت آنتی‌آنژیوژنز و آنتی‌توموری دارد(۱۷). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که ملیتین باعث مهار رشد سلول‌های سرطان تخمدان و آپوپتوز از طریق افزایش بیان گیرنده‌های مرگ در این سلول‌ها می‌شود(۱۸). این پپتید با مهار بیان MMP-9 که در متاستاز نقش دارد از مهاجرت سلول سرطانی جلوگیری می‌کند(۱۹). Gayski و همکاران بیان کردند که ملیتین چندین مکانیسم از قبیل تغییرات چرخه سلولی و مهار رشد و تکثیر سلولی و القا آپوپتوز در سلول‌ها را باعث می‌شود(۲۰). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که Rac1 پروتئینی است که در مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد(۲۱). متاستاز و مهاجرت سلول در چهار مرحله شامل قطبی شدن و برآمدگی قسمتی از سلول و تماس مجدد این قسمت به سطح جدید و جابه جایی سلول و جمع شدن آن می‌باشد که در این مراحل نیازمند پلیمریزاسیون اکتین و Rac1 می‌باشد(۲۲). WU و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

افزایش بیان Rac1 همراه با افزایش متاستاز در سرطان معده بوده است(۹). Wang و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کردند که اهداف داخل سلولی ملیتین گروه‌های مختلفی از قبیل کانال‌های کلسیمی و فسفولیپازها است که یکی از آنها Rac1 می‌باشد(۲۳). با توجه به نقش Rac1 در متاستاز، اهمیت تحقیقات در زمینه مهار این پروتئین و جلوگیری از متاستاز را عنوان می‌کند. Mahmoodzadeh و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که ملیتین مهارکننده رشد سلول‌های سرطان معده رده سلولی AGS می‌باشد و این اثر مهاری با افزایش غلظت ملیتین و مدت زمان اثر، افزایش می‌یابد(۱۴). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بیان شد که ملیتین بر سلول‌های گردن رحم رده سلولی HELA تأثیر مهاری داشته است(۲۴). بنابراین در این دو مطالعه اثر مهاری ملیتین بر روی این دو رده سلولی بررسی شده است. در مطالعه حاضر سعی شده تا تأثیر ملیتین بر روی یکی از پروتئین‌های اصلی دخیل در متاستاز بررسی گردد که نتایج حاصل از تیمار سلول‌های AGS با ملیتین و آنالیز باندهای حاصل از وسترن بلات نشان داد که پپتید مورد نظر تأثیری بر میزان بیان پروتئین Rac1 ندارد. با توجه به مطالعاتی که در سرطان کبد توسط Liu و همکاران انجام شد، نشان دادند که ملیتین به صورت In vitro و In vivo از طریق کاهش بیان Rac1 از متاستاز سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند(۱۳). نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که ملیتین تأثیری روی میزان بیان پروتئین Rac1 در سلول‌های AGS ندارد که همسو بودن این دو مطالعه را رد می‌کند.

در این مطالعه رده سلولی AGS از سرطان معده بررسی شد و با توجه به اینکه هر ارگانی از بدن ویژگی‌ها و سیگنال‌های خاص خود را دارد و یک دارو نمی‌تواند بر روی انواع رده‌های سلول‌های سرطانی ارگان‌های مختلف به میزان یکسان اثر داشته باشد، عدم تأثیر ملیتین بر روی پروتئین موردنظر در یکی از رده‌های سلولی سرطان معده را توجیه می‌کند.

اینکه ملیتین از مسیر دیگر در سلول‌های سرطان معده از متاستاز و رشد آنها جلوگیری می‌کند قابل بررسی و تحقیق می‌باشد. مطالعه حاضر ارتباط بین تأثیر ملیتین روی بیان Rac1 در سلول‌های سرطانی AGS را رد می‌کند.

سپاسگزاری

در اینجا لازم می‌دانیم از همکاری کلیه اساتید و کارکنان گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد کمال تشکر را داشته باشیم.

References:

1- Roder DM. ***The epidemiology of gastric cancer.*** Gastric Cancer 2002; 5 (Suppl 1): 5-11.

2- Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni Jr JF, Correa P, Rosenberg PS, Rabkin CS. ***Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults.*** JAMA 2010; 303(17): 1723-8.

3- Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. ***Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review.*** Gastric Cancer 2005; 8(2): 86-94.

4- Kamai T, Shirataki H, Nakanishi K, Furuya N, Kambara T, Abe H, et al. ***Increased Rac1 activity and Pak1 overexpression are associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis of upper urinary tract cancer.*** BMC Cancer 2010; 10(1): 164.

5- 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 jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

6- 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.

7- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, et al. ***Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b.*** Oncogene 2000; 19(26): 3013-20.

8- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, et al. ***Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization.*** Nature 1998; 393(6687): 809-12.

9- WU K, JIANG L. ***Expression and significance of Rac1 and Pak1 in gastric cancer.*** Intl J Pathol Clin Med 2010; 6: 004.

10- Terra R, Guimarães JA, Verli H. ***Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin.*** J Mol Graph Model 2007; 25(6): 767-72.

11- Sharma S. ***Melittin resistance: a counterselection for ras transformation.*** Oncogene 1992; 7(2): 193-201.

12- Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. ***Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds.*** Pharmacol Ther 2007; 115(2): 246-70.

13- 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.

14- Mahmoodzadeh A, Morady A, Zarrinnahad H, Pooshang Bagheri K, Ghasemi-Dehkordi P, Mohdavi M, et al. ***Isolation of melittin from bee venom and evaluation of its effect on proliferation of gastric cancer cells.*** Tehran Univ Med J 2012; 70(12): 760-7. [Persian]

15- Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. ***The future of gastric cancer prevention.*** Gastric Cancer 2004; 7(1): 9-16.

16- Chambers AF, Matrisian LM. ***Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.*** J National Cancer Inst 1997; 89(17): 1260-70.

17- Huh JE, Kang JW, Nam D, Baek YH, Choi DY, Park DS, et al. ***Melittin suppresses VEGF-A-induced tumor growth by blocking VEGFR-2 and the COX-2-Mediated MAPK Signaling pathway.*** J Nat Prod 2012; 75(11): 1922-9.

18- Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, et al. ***Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway.*** Toxicol Appl Pharmacol 2012; 258(1): 72-81.

19- Park JH, Jeong YJ, Park KK, Cho HJ, Chung IK, Min KS, et al. ***Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF-κB and AP-1-dependent MMP-9 expression.*** Mol Cells 2010; 29(2): 209-15.

20- Gajski G, Garaj-Vrhovac V. ***Melittin: a lytic peptide with anticancer properties.*** Environ Toxicol Pharmacol

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

2013; 36(2): 697-705.

21- Schmitz AA, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L. ***Rho GTPases: signaling, migration, and invasion.*** Exp Cell Res 2000; 261(1): 1-12.

22- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. ***Regulation of cancer cell motility through actin reorganization.*** Cancer Sci 2005; 96(7): 379-86.

23- Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lü X, et al. ***Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IκBα kinase-NFκB.*** J Biol Chem 2009; 284(6): 3804-13.

24- 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 of cervical cancer- hela cell line.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(2): 226-38. [Persian]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

The Effect of Melittin on Rac1 Protein Expression as a Metastatic Factor in AGS Gastric Cancer Cell Lines

Hemati M(Msc)[1], Eivazi N(MSc)[2], Chakerzehi A(MSc)[3], Moradi A(PhD)[*4], Mohiti Ardakani J(PhD)[5], Mahmoodzade A(MSc)[6]

[1-6]Department of Biochemistry & Molecular Biology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 28 Dec 2013 ***Accepted:*** 17 Apr 2014

Abstract

Introduction: Understanding the molecular mechanisms of metastasis is important for the design and effective use of novel therapeutic strategies in order to combat metastases. One class of molecules that has been implicated in metastasis is Rac1. Regarding complications of conventional therapies such as chemotherapy, current studies are evaluating natural compounds with anticancer Properties. Melittin is a natural compound derived from honey bee venom which has revealed amphipatic properties. Some studies have shown that melittin has an important role in reducing cancer cells metastasis by affecting Rac1 expression. Since the studies on melittin role in regard to Rac1 in gastric cancer cells are rare, the present study examined the effect of melittin on Rac1 protein expression in AGS gastric cancer cells.

Methods: AGS cells, after growth and reaching to 80% density, were exposed to 0.2, 0.3, 0.4 µg/ml concentrations of melittin (test groups) for six hours. Then cells were collected, lysed with lysis buffer and Rac1 protein was identified by Western blotting technique. Data were normalized with the β-Actin internal control and calculated as the relative percentage. The study data were analyzed using SPSS statistical software via One-Way Anova test.

Results: Comparison of Rac1 expression levels in AGS cancer cells showed that cells which were exposed to 6 hours of 0.2µg/ml (109±5.5), 0.3(105±3.6) melittin had higher Rac1 expression percentages compared to the control (100) and 0.4 (100±2). Rac1 expression percentages were not significant with a confidence interval (CI) of 95% (P>0.05).

Conclusion: In this study the results demonstrated that melittin does not have any effect on Rac1 in gastric cancer cells (AGS).

Keywords: Gastric Cancer; Melittin; Metastasis; Rac1

This paper should be cited as:
Hemati M, Eivazi N, Chakerzehi A, Moradi A, Mohiti Ardakani J, Mahmoodzade A. ***The effect of melittin on rac1 protein expression as a metastatic factor in AGS gastric cancer cell lines***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(2): 1001-9.

****Corresponding author: Tel: +98 9126706056, Email: morady2008 @gmail.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]