

تقویت اثر داروی شیمی درمانی ۵-فلوروئوراسیل توسط توکسین منفذساز فراگاسئاتوکسین C در رده سلولی سرطان پستان MCF-7

محمدحسن خیراندیش^۱، حسین زارعی جلیانی^{۲*}، مهدی ایمانی^۳

مقاله پژوهشی

مقدمه: شیمی درمانی به دلیل 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 شیمی درمانی ۵-فلوروئوراسیل بر رده سلولی 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 XhoI و NcoI، وارد وکتور بیانی pET28a شد. بیان توکسین در باکتری اشریشیا کلی به وسیله IPTG القا شد و توکسین به وسیله روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص شد. پس از بررسی فعالیت همولیز توکسین به وسیله روش توربیدومتری، اثرات سیتوتوکسیک و تقویت اثر داروی ۵-فلوروئوراسیل به وسیله سنجش تریپان بلو و تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. تحلیل داده‌ها به وسیله تست T-student و نرم افزار SPSS Inc Version v16 در سطح معنی داری پنج درصد انجام شد. **نتایج:** توکسین FraC در باکتری اشریشیا کلی به صورت نوترکیب تولید شده و به صورت خالص با خلوص نسبی حدود ۸۶ درصد تهیه شد. اثرات سیتوتوکسیک این توکسین بر روی رده سلولی MCF-7 وابسته به دوز و زمان تیمار است. مقدار IC₅₀ برای توکسین برابر ۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. در دوزهای غیرکشنده، این توکسین باعث تقویت اثر ۴ تا ۶ برابری داروی شیمی درمانی ۵-فلوروئوراسیل در زمان‌های مختلف (۲۴ تا ۷۲ ساعت) می‌شود. **نتیجه گیری:** تقویت اثر داروی شیمی درمانی ۵-فلوروئوراسیل با تسهیل ورود این دارو به سلول‌های سرطان پستان MCF-7 توسط توکسین منفذساز FraC می‌تواند از عوارض شیمی درمانی 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 شیمی درمانی ۵-فلوروئوراسیل توسط توکسین منفذساز فراگاسئاتوکسین C در رده سلولی 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 علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات زیست فناوری، 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: zareij@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۶۹۷۸۴۷۷

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 (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 دو گروه 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 کِلستریدیوم 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 داروی شیمیایی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. اما درمورد خانواده بتا که می‌توان به گروه توکسین‌های (Cholesterol-dependent cytolysin) CDC 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب

پلاسمید حاصل از مرحله قبل، به‌ترتیب در دو باکتری DH5 α و سپس BL21 (DE3) که به‌وسیله روش شیمیایی کلسیم‌کلرید مستعد شده بودند، کلون شدند. کلونی‌های باکتری BL21 (DE3) در محیط کشت LB دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار لاککاننده 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

کشت سلول MCF-7

رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 در حضور ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین/ استرپتومایسین) در انکوباتور CO₂ 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-فلورورئاسیل بر روی 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-فلورورئاسیل 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 الیزا 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 IC₅₀ 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

NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار، گلیسرول ۱۰٪ و ۲-مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار) در دستگاه سونیکاتور به‌مدت ۳۰ ثانیه با شدت ۶۰ درصد (با ۱۰ تکرار) بر روی یخ سونیکه شد. سوپ محلول حاصل از لیز این باکتری‌ها بر روی ستون میل ترکیبی Ni-NTA (رزین محصول شرکت کی‌آزن) 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 هر کدام 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:

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

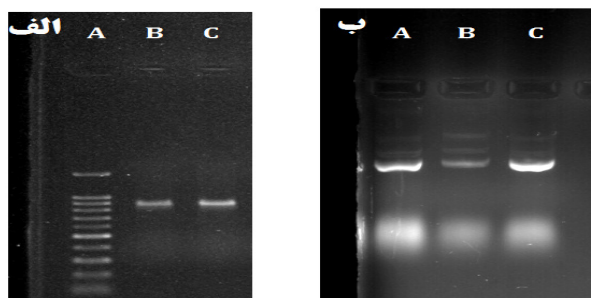
با این توضیح که A_{max} بالاترین جذب مشاهده شده برای محلول RBC دست‌نخورده در هر سنجش و A_{min} میزان جذب همان محلول RBC در مجاورت بالاترین غلظت توکسین پس از زمان ۲ ساعت است. پارامتر A_{test} میزان جذب هر نمونه است که پس از زمان انکوباسیون هر سنجش در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

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.

لیگازی انکوبه شد و در باکتری مستعد شده DH5 α کلون گردید. شکل ۱ (ب) نشان‌دهنده تخلیص پلاسمید با روش دستی و رسوب ایزوپروپانول است که از سه کلونی باکتری ترانسفورم شده DH5 α تخلیص شده است. کلونی‌های حاصل از ترانسفورم باکتری DH5 α در روز بعد کشت داده شدند و با روش دستی، پلاسمید موجود در آن‌ها تخلیص شد.

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



شکل ۱: مراحل کلونینگ ژن توکسین FraC.

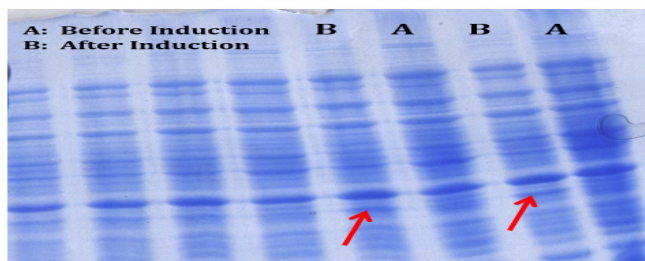
بخش الف: ژل آگاروز ۱/۲ درصد که در آن محصول PCR ژن فراگاستاتوکسین C بارگذاری شده است. قطعه ژن توکسین تکثیر شده در سایز حدود ۹۰۰ جفت‌باز در چاهک‌های ۲ و ۳ مشخص است. بخش ب: نشان‌دهنده پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از کلونی‌های مختلف باکتری DH5 α است.

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.

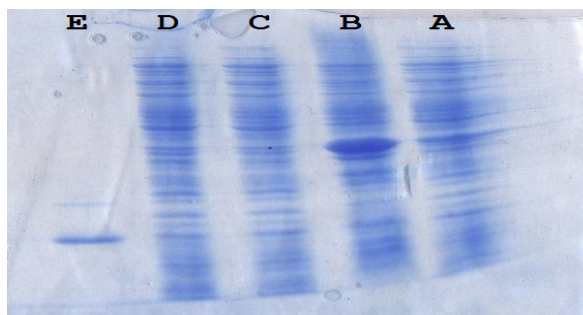
القای بیان پروتئین نوترکیب FraC

کلونی‌های باکتری BL21 حاوی وکتور بیانی pET28a-FraC در محیط کشت 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).



شکل ۲: القای بیان پروتئین نوترکیب FraC.

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



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

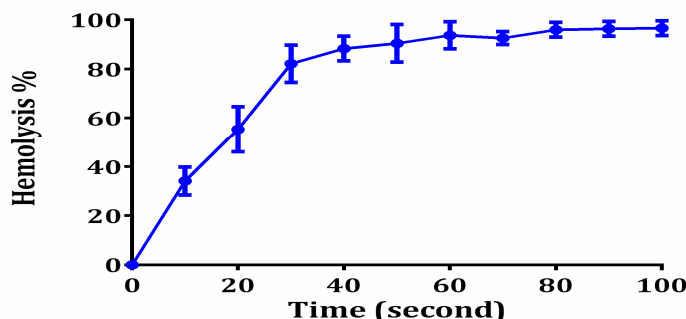
ژل پلی اکریل آمید ۱۵٪ از نمونه‌های تخلیص پروتئین در شکل نشان داده شده است. نمونه‌های A و B قبل و بعد از القاء نمونه C سوپ حاصل از لیز باکتری، نمونه D فلوئرو (Flowthrough) عبوری از ستون و نمونه E نشان‌دهنده فرکشن تخلیص شده از ستون است.

فعالیت همولیز توکسین FraC

گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، توکسین با یک روند وابسته به زمان باعث لیز گلبول قرمز می‌شود. 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.

پس از تخلیص توکسین نو ترکیب، 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

Hemolysis of recombinant FraC toxin



شکل ۴: فعالیت همولیز توکسین نو ترکیب FraC.

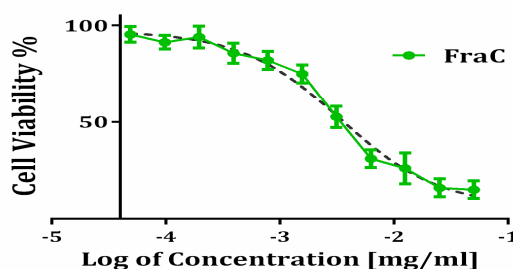
تغییرات OD نمونه گلبول قرمز در سنجش همولیز (طول موج ۶۰۰ نانومتر) برحسب زمان ثبت شد و با تبدیل مقادیر OD به درصد همولیز در شکل نشان داده شده است.

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.

میزان زنده مانی سلول MCF-7 در حضور توکسین نو ترکیب FraC

سلول‌های MCF-7 در محیط RPMI کشت داده شدند و در حضور غلظت‌های مختلف و افزایش 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

MCF-7 Cell Viability in the presence of recombinant FraC toxin (Trypan Blue dye exclusion assay)



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

میزان زنده ماندنی سلول‌های MCF-7 در حضور غلظت‌های مختلف توکسین نو ترکیب FraC در سنجش تریپان بلو محاسبه گردید.

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

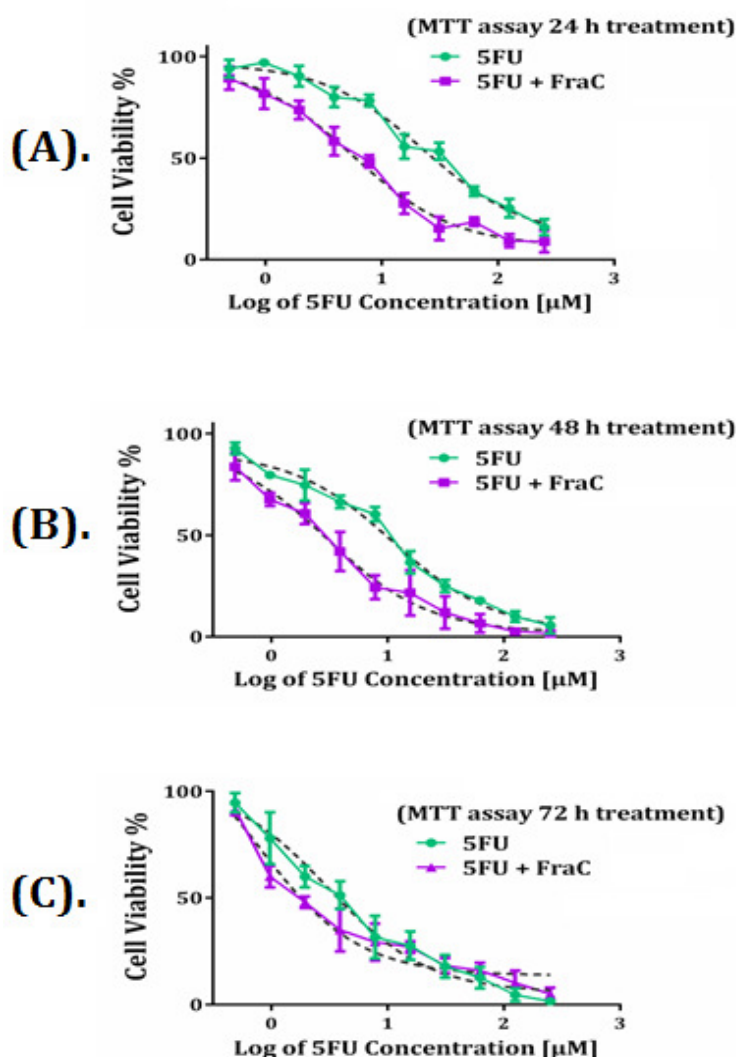
برای بررسی تقویت اثر (Potentiation) داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروپوراسیل در رده‌سلولی MCF-7، غلظت‌های غیرکشنده توکسین FraC نو ترکیب (۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) بر سلول MCF-7 به مدت ۵ دقیقه مجاور شد و سپس غلظت‌های مختلف ۵-فلوروپوراسیل بر سلول اثر داده شد. این آزمایش با داروی ۵-فلوروپوراسیل بدون حضور توکسین به‌طور هم‌زمان و در یک پلیت تکرار شد. برای توکسین نو ترکیب 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-فلوروپوراسیل بر سلول‌ها در حضور و عدم حضور توکسین نو ترکیب مشاهده می‌شود. مقادیر IC_{50} که با نرم‌افزار Graphpad بدست آمده است در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. همان‌طور که مشخص است، غلظت‌های غیرکشنده توکسین نو ترکیب FraC باعث افزایش ۴ تا ۶ برابری اثرات کشندگی داروی ۵-فلوروپوراسیل 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-فلوروپوراسیل و یا ترکیب این دارو و توکسین FraC در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با $p \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار بود. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) حاصل از آنالیز t test سه بار تکرار نشان داده شده‌اند.



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 غلظت‌های 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 اولین بار ساختمان پروتئینی آن تعیین شده است، سنتز شد و طی مراحل 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 بر روی داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروراسیل مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در بخش نتایج مشخص است، در این مطالعه این

پروتئین به صورت نو ترکیب به خوبی بیان و تخلیص شد. با این که تعداد کمی از تحقیقات در مورد مهندسی توکسین های منفذساز منتشر شده است، اما می توان دریافت که پایانه آمین توکسین های خانواده اکتینوپورین ها که از توکسین های منفذساز آلفا به شمار می روند برای عملکرد آن ها بسیار ضروری است (۱۵،۱۶). به همین دلیل، توکسین در این مطالعه به گونه ای تولید شد که برچسب هیستیدین برای تخلیص پروتئین در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار بگیرد.

نتایج به دست آمده از سنجش فعالیت همولیتیک توکسین نو ترکیب FraC، مطابق با مشاهدات انجام شده در مطالعه بلومبو و همکاران ایشان بود. طی مطالعه ای که این گروه انجام داد، توکسین FraC به صورت نو ترکیب (از باکتری *E. coli*) و طبیعی (مستقیماً از شقایق توت فرنگی) تخلیص شد و اثر همولیتیک آن ها 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 به عنوان حد آستانه وجود دارد که پایین تر از آن همولیز انجام نمی شود و در غلظت ۵۰ نانومولار میزان همولیز برای هر دو پروتئین به ۱۰۰ درصد می رسد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که توکسین نو ترکیب تخلیص شده FraC در این طرح در غلظت های بالاتر فعالیت همولیتیک بالاتری نشان می دهد و در غلظت تقریباً معادل با غلظت مطالعات قبلی فعالیت آن به حداکثر می رسد (۱۷،۱۸،۱۹). میزان IC_{50} غلظتی که در آن ۵۰ درصد از اریتروسیت ها لیز می شوند، در مطالعه ما برابر ۹ نانومولار و در مطالعه بلومبو برای توکسین نو ترکیب ۶/۵ نانومولار گزارش شد. به نظر می رسد که فعالیت بیولوژیک توکسین نو ترکیب 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 تریپان بلو برای توکسین های منفذساز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، هر چند که برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک خانواده های

پروتئینی دیگر و همچنین داروهای شیمیایی کوچک مولکول، سنجش های دیگر از قبیل MTT، XTT مؤثرتر نشان می دهند. توکسین های منفذساز باعث نفوذپذیر شدن غشای سلولی می شوند و با از دست رفتن تعادل آب و الکترولیت ها در دو طرف غشای پلاسمایی، سلول ها مرگ برنامه ریزی شده را تجربه می کنند. برای بررسی اثرات توکسین های منفذساز بر سلول های هدف هیچ سنجشی بهتر از تریپان بلو نمی توان استفاده کرد، چراکه دقیقاً سازوکار اصلی عملکرد این توکسین ها بر سلول نیز همان است که در سنجش تریپان بلو مورد بررسی قرار می گیرد. همان طور که در مطالعات سایر محققین نیز آمده است، سلول های تحت تاثیر توکسین های منفذساز، هنگامی که آسیب می بینند، در همان دقایق اولیه سریعاً در سنجش تریپان بلو این آسیب را نشان می دهند. حتی زمانی که در سنجش تریپان بلو سلول ها رنگ می گیرند، ممکن است در صورت پایین بودن غلظت توکسین و ترمیم غشای خود، بتوانند زنده بمانند و تریپان بلوی وارد شده به سیتوپلاسم خود را به بیرون پمپ کنند (۲۰،۲۱). به بیان دیگر مرگ سلولی گزارش شده در سنجش تریپان بلو با مرگ گزارش شده در سنجش های دیگر متفاوت است. بنابراین بهترین سنجش برای بررسی اثر توکسین های منفذساز بر غشای سلولی سنجش تریپان بلو است. در این سنجش همان طور 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 می شود و سلول در سنجش تریپان بلو به سرعت رنگ می گیرد. اتصال اولیه اسفنگومیلین به توکسین FraC برای درج شدن در غشا الزامی است (۲۲،۲۳).

در این تحقیق، اثرات داروی شیمی درمانی ۵-فلوروپوراسیل در حضور غلظت های غیرکشنده FraC نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در نتایج مشخص شد، توکسین نو ترکیب FraC در غلظت هایی که فاقد اثرات کشندگی بود باعث تقویت اثر داروی شیمی درمانی ۵-فلوروپوراسیل شد. در مطالعه ای با طراحی مشابه که توسط سولتی و همکاران انجام شد، غلظت های غیرکشنده ای از توکسین Bc2 و اِکیناتوکسین

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-فلوروپوراسیل با تسهیل ورود این دارو به سلول‌های سرطانی MCF-7 توسط توکسین فراگاستاتوکسین C می‌تواند از عوارض شیمی‌درمانی آن بکاهد. به نظر می‌رسد در صورتی که بتوان با مهندسی پروتئین اثرات کشنده توکسین‌های منفذساز را از سلول‌های طبیعی حذف کرد، می‌توان از این توکسین‌ها به عنوان 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.

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 سینرژسم توکسین اپسیلون با داروی شیمی‌درمانی متوترکسات در رده‌های سلولی سرطان‌های ریه و پستان مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق نیز غلظت‌های بسیار پایین و غیرکشنده توکسین باعث تقویت اثر داروی متوترکسات گردید. در صورت بهبود دسترسی داروهای شیمی‌درمانی به داخل 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 هدف‌گیرنده‌ای 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

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*. Pancreatolgy 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*

- 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*. Iran J 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.

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

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

Mohammad Hassan Kheirandish¹, Hossein Zarei Jaliani^{†1,2}, Mehdi Imani³

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.

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

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

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

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