



بررسی اثر سایتوتوکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطانی T47D

فاطمه کاظمی لمعه دشت: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).

fa_kazemi@pasteur.ac.ir

مهدی بهدانی: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دلاور شهباززاده: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

عقرب همیسکورپیوس لپتوروس،
سرطان پستان،
T47D،
اثر سایتوتوکسیک

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۰۹

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از عوامل عمده مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان می‌باشد. زهر عقرب حاوی پروتئین‌ها و پپتیدهای مختلفی می‌باشد که دارای فعالیت سایتوتوکسیک، آپوپتوتیک و مهارتی علیه انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سایتوتوکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطانی T47D می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه سلول‌های T47D به صورت تک لایه در محیط RPMI1640 کشت داده شدند و سپس با روش رنگ سنجی MTT، میزان توکسیسیتی زهر عقرب بر روی رده سلولی T47D مورد بررسی قرار گرفت و IC_{50} آن تعیین شد. رده سلولی HEK 293 به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: داده‌های MTT assay نشان داد که زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس اثر کشندگی وابسته به دوز و غلظت روی رده سلولی T47D دارد. درحالی‌که در دوز یکسان چنین اثری بر روی رده سلولی کنترل HEK 293 مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده حاکی از اثر ضد سرطانی زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطان پستان (رده سلولی T47D) می‌باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: موسسه انستیتو پاستور ایران (شماره گرنت: ۸۵۴)

شیوه استناد به این مقاله:

Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Shahbazzadeh D. Cytotoxic effect *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on T47D breast cancer cell line. Razi J Med Sci. 2019;26(10):1-7.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Cytotoxic effect *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on T47D breast cancer cell line

- © **Fatemeh Kazemi-Lomedasht**, Biotechnology Research Center, Biotechnology Department, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (* Corresponding author) fa_kazemi@pasteur.ac.ir
Mahdi Behdani, Biotechnology Research Center, Biotechnology Department, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Delavar Shahbazzadeh, Biotechnology Research Center, Biotechnology Department, Venom and Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: Breast cancer is one of the most related cancer deaths among women. The scorpion venom consists of various peptides and proteins with cytotoxic, apoptotic and growth inhibitory effects on various cancers. Studying the cytotoxic effect *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on T47D breast cancer cell line was the main aim of this study.

Methods: The T47D cells were cultured as monolayer in RPMI1640 medium. The toxicity of the scorpion venom on T47D cell line was evaluated by MTT assay and the IC₅₀ was calculated. The HEK293 cell line was used as control cell line.

Results: The MTT assay results showed the time and dose-dependent inhibitory effect of *H. lepturus* venom on T47D cell line. However, such effect was not observed on HEK293 cell line in identical dose.

Conclusion: The achieved results indicate the anticancer effect of *H. lepturus* venom on T47D breast cancer cell line.

Conflicts of interest: None

Funding: Pasteur Institute of Iran (grant no: 854)

Keywords

Hemiscorpius lepturus,
Breast cancer,
T47D,
Cytotoxic effect

Received: 13/07/2019

Accepted: 30/11/2019

Cite this article as:

Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Shahbazzadeh D. Cytotoxic effect *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom on T47D breast cancer cell line. Razi J Med Sci. 2019;26(10):1-7.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) licence.



کانال‌های کلسیمی اثر می‌گذارد و مطالعات نشان داده‌اند که برای موش سیتوتوکسیک می‌باشد (۶). همی نکرولیزین نیز پروتئین ۳۲ کیلودالتونی است که برای گلوبول‌های قرمز همولیتیک می‌باشد (۷). این پروتئین نیز توسط بورشانی و شهباززاده جداسازی گردیده است (۷). اگرچه پیشرفت‌هایی در مطالعات برخی توکسین‌ها به وجود آمده است اما مراکز کمی به پژوهش در این زمینه پرداخته‌اند؛ بنابراین اطلاعات کمی در این زمینه به‌منظور شناسایی کامل اجزای زهر وجود دارد (۸). در این مطالعه قصد داریم برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس را بر روی رده سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار دهیم.

روش کار

کشت رده سلولی T47D: رده سلولی T47D از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و در محیط کشت سلولی RPMI 1640 (Gibco)، حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/mL) / استرپتومایسین (۱۰۰ mg/mL) (Gibco)، سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد انکوبه گردید.

بررسی توکسیسیتی: به منظور بررسی سیتوتوکسیسیتی زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطان پستان از روش MTT assay استفاده شد (۹). معرف MTT (۳ و ۵ دی متیل تيازول -۲-یل -۲و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) که یک نمک تترازولیوم (Tetrazolium) محلول و زرد رنگ است، توسط میتوکندری سلول‌های زنده و فعال جذب شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازان (Formazan) نامحلول و بنفش رنگ می‌کند که در حلال مناسب حل‌شده و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای هر نوع سلولی باید با رسم منحنی استاندارد خطی، رابطه متناسبی از تعداد سلول و رنگ تولید شده را به دست آورد. در هر خانه ۹۶ تایی ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد که سلول‌ها حتماً باید ته

سرطان پستان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ زنان از سرطان در دنیا محسوب می‌گردد. سرطان پستان مسئول ۲۴/۶ درصد از سرطان‌ها در بین زنان ایرانی می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که میانگین سنی زنان مبتلا ۴۹ سال می‌باشد (۱). علاوه بر مرگومیر انسان‌ها، بار اقتصادی این بیماری نیز برای جامعه بسیار زیاد است به طوری که این بیماری حداقل ۶ هزار میلیارد تومان در سال، بار مالی به ملت و دولت تحمیل می‌کند. درمان سرطان به روش‌های گوناگون انجام می‌شود، درمان‌های موجود برای برخی سرطان‌ها به خوبی پاسخگو بوده و درصد بالایی از بیماران بهبود می‌یابند ولی به‌طورکلی درمان‌های عمومی سرطان مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی علاوه بر این که باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شوند، روی سلول‌های طبیعی نیز اثر می‌گذارند ولی با توجه به شرایط بیمار، این‌گونه عوارض جانبی به علت اهمیت درمان سرطان پذیرفته می‌شود (۲). کشف مولکول‌ها با پتانسیل دارویی از منابع طبیعی یکی از موارد با اهمیت بشمار می‌رود. از طرفی به علت شکست‌های پی‌درپی در درمان سرطان تلاش همچنان جهت یافتن داروی مناسب‌تر و کارا تر ادامه دارد. عقرب *Hemiscorpius lepturus* متعلق به خانواده *Hemiscorpiidae* است که به عنوان عقرب Gadim (نام محلی آن در استان خوزستان) شناخته می‌شود. این عقرب به عنوان خطرناک‌ترین گونه عقرب‌های رایج در ایران است و مسئول ۶۷٪ مرگومیرهای مربوط به عقرب‌گزیدگی می‌باشد. زهر عقرب حاوی پروتئین‌ها و پپتیدهای مختلفی می‌باشد که دارای فعالیت ایمونوساپرسیو، سیتوتوکسیک، آپوپتوتیک و مهاری علیه انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشند (۳، ۴). پپتیدی به نام همی توکسین HTX یک مهارکننده کانال‌های پتاسیمی می‌باشد که توسط دکتر شهباززاده و همکاران از همیسکورپیوس لپتوروس جداسازی گردیده است (۵). همی کلسین HCa پپتید دیگری است که توسط شهباززاده و همکاران از همیسکورپیوس لپتوروس جداسازی گردیده و بر روی

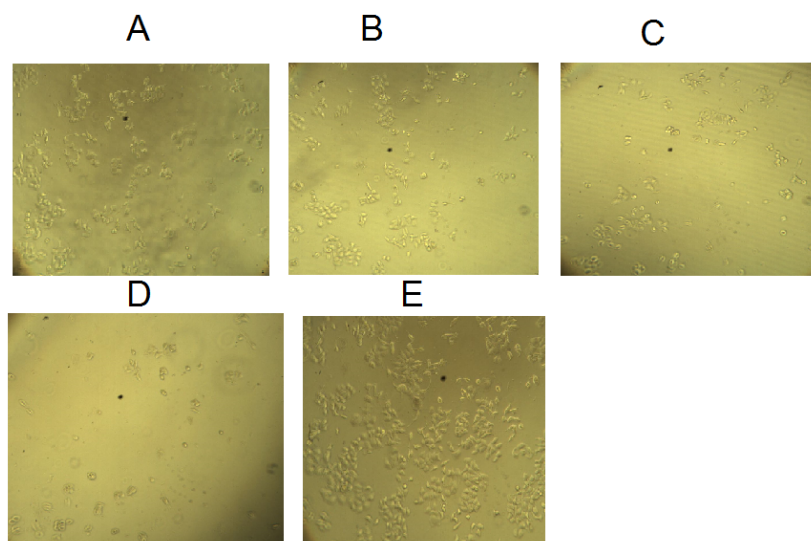
برای کنترل، سه بار تست تکرار شده بود لذا از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تاثیر زهر عقرب روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین گردید.

میزان جذب سلول‌های تیمار شده/میزان جذب سلول‌های تیمار نشده $\times 100 =$ درصد مهار هر چه دارو سمیت کمتری داشته باشد تعداد سلول‌های زنده بیشتر، رنگ بنفش بیشتر بوده و میزان جذب نیز بالاتر خواهد بود. در پایان با رسم منحنی نقطه‌ای در نرم افزار GraphPad Prism 5 و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط میزان غلظتی از زهر عقرب که باعث مرگ ۵۰٪ از سلول‌ها می‌شود یا (به عبارتی IC_{50} - Half maximal inhibitory concentration) برای آن دوره زمانی محاسبه گردید.

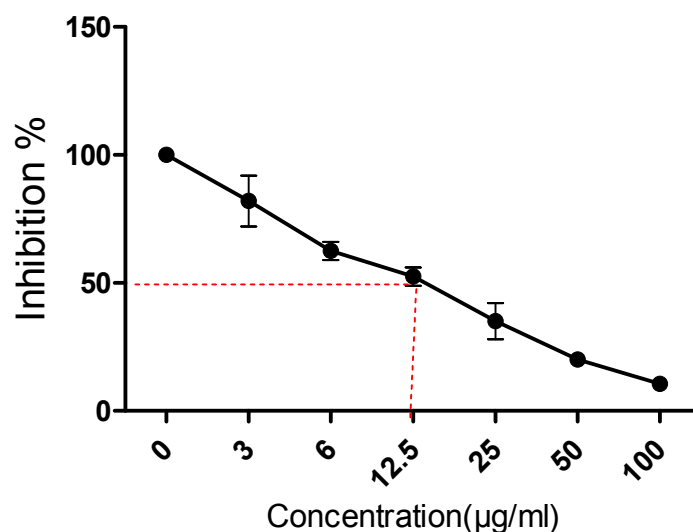
یافته‌ها

نتایج MTT assay در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی رده سلولی T47D می‌باشد. در غلظت‌های بالا تر از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر درصد کشندگی تقریباً صد در صد می‌باشد. تغییر در مورفولوژی سلول‌های T47D حاکی از توکسیک بودن زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس می‌باشد (شکل ۱). مقدار عددی IC_{50} ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر در

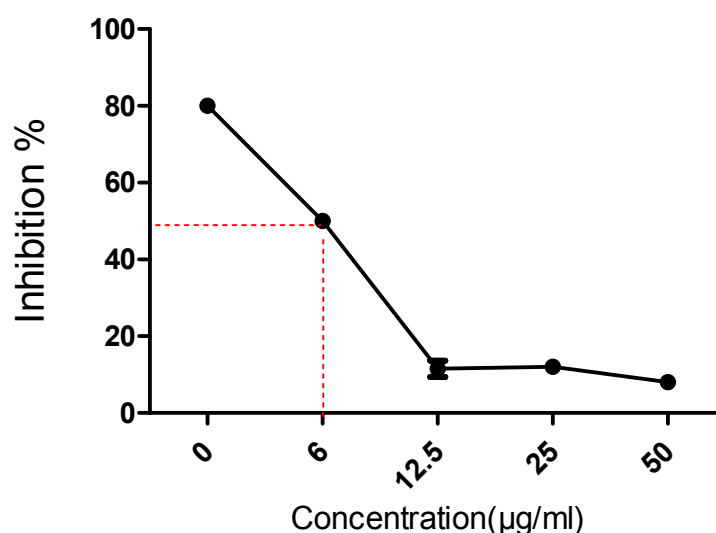
خانه های پلیت قرار گرفته و به دیواره نچسبد. برای ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به همه چاهک‌های پلیت اضافه شد. از غلظت‌های مختلف زهر عقرب (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳ و ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر) به ترتیب که از بالا به پایین از هر کدام به چاهک‌های جداگانه اضافه گردید. تمامی تست‌ها به صورت سه تایی انجام گرفت. چاهک A در بالای پلیت سمت چپ بالاترین غلظت (۱۰۰ میکرولیتر) را دارد. چاهک آخر چاهک کنترل است. همچنین پلیت‌ها برای دو زمان متفاوت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت تقسیم بندی شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط $37^{\circ}C$ درجه سانتیگراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO_2 انکوبه شد. از سلول HEK 293 به عنوان کنترل سلول‌های طبیعی استفاده شد. سپس در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلیگرم در میلی لیتر) اضافه گردید. پلیت‌ها در تاریکی و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس MTT از چاهک‌ها حذف گردید و به هریک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جهت جلوگیری از اثر نور محیط، پلیت مربوطه داخل فویل آلومینیومی پیچیده شد. سپس به کمک دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر (طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر) جذب آن قرائت گردید. با توجه به اینکه برای هر غلظت و همچنین



شکل ۱- تغییرات مورفولوژی سلول‌های T47D پس از تیمار با زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس. (A) پس از ۱ ساعت تیمار با زهر، (B) پس از ۲ ساعت، (C) پس از ۳ ساعت تیمار با زهر، (D) پس از ۴ ساعت تیمار با زهر، (E) پس از ۱ ساعت تیمار با زهر، (B) پس از ۲ ساعت،



نمودار ۱- نتایج MTT assay در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطان پستان T47D. IC_{50} در زمان ۲۴ ساعت بعد از تیمار ۱۲/۵ میکروگرم می‌باشد.



نمودار ۲- نتایج MTT assay در زمان ۴۸ ساعت بر روی رده سلولی سرطان پستان T47D. IC_{50} در زمان ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۶ میکروگرم می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در طی هزاران سال طبیعت منبعی از محصولات دارویی بوده است که در میان آنها زهر مار و عقرب، که دارای مولکولهای بیولوژیکی مختلفی از قبیل پپتیدها، پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی با عملکردهای مهم فارماکولوژیکی هستند، از اهمیت زیادی برخوردارند و می‌توانند برای درمان بیماری‌های انسانی از قبیل انواع سرطان‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۴، ۱۰، ۱۱). درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی‌درمانی می‌باشد که اغلب موارد سلول‌های سالم

زمان ۲۴ ساعت آنکوباسیون (نمودار ۱) و IC_{50} ۶ میکروگرم در میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت آنکوباسیون (نمودار ۲) محاسبه گردید. این درحالی است که بر روی رده سلولی HEK 293 در غلظت‌های بالا تر از ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر اثر مهاری مشاهده گردید. در واقع نتایج حاکی از آن است که اثر مهاری و توکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطان بیشتر از اثر مهاری بر روی رده سلولی طبیعی می‌باشد.

بسیاری از داروهای ضد سرطان بر روی سلولهای طبیعی انسان هم اثر می‌گذارد اما یافتن دوزی که تنها بر روی سلولهای سرطانی تاثیر گذار باشد از اهمیت بالایی برخوردار است. در واقع میتوان با بهینه سازی دوز از اثرات احتمالی توکسیسیته بر روی سلولهای طبیعی کاست و در عین حال با اختصاصیت بالاتری باعث مهار و از بین رفتن سلولهای سرطانی گردید. در این مطالعه برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه برای اولین بار اثر سیتوتوکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بر روی رده سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده امیدوار کننده می‌باشد و حاکی از پتانسیل بالای زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس برای مطالعات کشف دارو می‌باشد. نتایج این مطالعه زمینه را برای مطالعات بیشتر به منظور یافتن ترکیب فعال موجود در زهر که خاصیت ضد سرطانی دارد فراهم می‌نماید.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران انجام شده است. نویسندگان کمال تشکر را از انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران دارند.

References

1. Jazayeri SB, Saadat S, Ramezani R, Kaviani A. Incidence of primary breast cancer in Iran: Ten-year national cancer registry data report. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(4):519-27.
2. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, Fotsis T. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. *Cancer Lett.* 2013;338:219-28.
3. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicol.* 2015;93:125-35.
4. King G. Venoms to drugs: venom as a source for the development of human therapeutics: RSC Advance; 2015.
5. Srairi-Abid N, Shahbazzadeh D, Chatti I, Mlayah-Bellalouna S, Mejdoub H, Borchani L, et al. Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *FEBS J.* 2008;275(18):4641-50.

نیز از بین می‌روند که این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگومیر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی‌درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود (۱۲، ۱۳). ایجاد تعادل بین اثرات درمانی و سمی یک ترکیب پارامتر مهمی است که توانایی و کاربرد داروهای جدید را مشخص می‌کند. به عبارت دیگر در طراحی یک داروی مفید و کاربردی باید توجه شود که ویژگی‌های سمی (توکسولوژیکال) و دارویی (فارماکولوژیکال) با یکدیگر تداخل نداشته باشند.

روش سنجش MTT یک روش دقیق و سریع برای بررسی سیتوتوکسیته داروهای ضد سرطان در شرایط آزمایشگاهی است که توسط Mosmann ارائه شده است و می‌تواند درصد سلول‌های زنده را در شرایط مختلف تشخیص دهد (۱۴، ۱۵). همچنین در افراد سرطانی می‌تواند پس از شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار بگیرد و از تجویز بی‌مورد داروهایی که اثرات جانبی زیادی دارند جلوگیری کرد (۱۶). در مطالعه حاضر نیز از روش MTT برای نشان دادن اثر سیتوتوکسیسیته زهر عقرب استفاده گردید. نتایج ما نشان داد که زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی رده سلولی سرطان پستان می‌باشد. زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس بسیار قوی است و شامل اجزای هموتوکسین و سیتوتوکسین می‌باشد. برخی از اثرات توکسیک زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در سال ۲۰۰۶ توسط پیلزاده و همکاران انجام شده است (۱۷). در مطالعه پیلزاده و همکاران نشان داده شد که زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس دارای اثرات همولیتیک، نفروتوکسیک و هپاتوتوکسیک می‌باشد. همی لیپین مولکول دیگری است (فسفولیپاز هتروداایمر) که از زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس جداسازی گردیده است. همی لیپین دارای اثر مهاری بر روی رگ‌زایی سلولهای اندوتلیال انسان می‌باشد و از مهاجرت و چسبندگی سلولها در طول عروق جلوگیری می‌نماید. این در حالی است که این مولکول باعث آپوپتوز سلولهای اندوتلیال انسان نمی‌شود (۱۸). هر چند که زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس نیز مانند

6. Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, et al. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels. *Biochem J*. 2007;404:89-96.
7. Borchani L, Sassi A, Shahbazzadeh D, Strub J-M, Tounsi-Guetteti H, Boubaker MS, et al. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon*. 2011;58(1):130-9.
8. Gazarian KG, Gazarian T, Hernández R, Possani LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine*. 2005;23(26):3357-68.
9. Sarzaem A, Mirakabadi AZ, Moradhaseli S, Morovvati H, Lotfi M. Cytotoxic Effect of ICD-85 (Venom-derived Peptides) on HeLa Can-cer Cell Line and Normal LK Cells using MTT Assay. *Arch Iranian Med (AIM)*. 2012;15(11).
10. Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics—cardiovascular examples. *Toxicon*. 2012;59(4):497-506.
11. King GF. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Exp Opin Biol Ther*. 2011;11(11):1469-84.
12. McPhee SJ, Papadakis MA, Tierney LM. *Current medical diagnosis & treatment 2010*: McGraw-Hill Medical New York: 2010.
13. Dancey J, Eisenhauer E. Current perspectives on camptothecins in cancer treatment. *Br J cancer*. 1996;74(3):327.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
15. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986;94(1-2):57-63.
16. Twentyman P, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*. 1987;56(3):279.
17. Pipelzadeh MH, Dezfulian A-R, Jalali MT, Mansouri AK. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon*. 2006;48(1):93-103.
18. Jridi I, Catacchio I, Majdoub H, Shahbazeddah D, El Ayeb M, Frassanito MA, et al. Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A2, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Toxicon*. 2015;105:34-44.