In-vitro evaluation of anti-cancer effects of melittin on non-small cell lung cancer

Pooyan Honari[1], Delavar Shahbazzadeh[2], Mahdi Behdani[2], Kamran Pooshang Bagheri[2]*

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University. Tehran, Iran.
2. Venom and Biotherapeutics Molecules Lab, Medical Biotechnology Dept., Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Non-small cell lung cancer (NSCLC) patients have a frequently poor prognosis and current therapies have large side effects. Numerous studies have been focused on the anti-cancer effects of melittin. Concerning the anti-cancer effects of melittin, this study aimed to evaluate melittin's anti-cancer effects on Calu-3 lung cancer cell line.

Material and Methods: Cytotoxicity of melittin on Calu-3 and MRC5 cells was assessed using MTT assay. Real-Time PCR was used to determine expression of apoptotic and pro-apoptotic *BAX*, *BCL2*, and *CASP3* genes. Furthermore, a wound healing assay was performed to compare the inhibition effects of melittin on the migration of interested cells.

Results: IC_{50} values of melittin for Calu-3 and MRC5 were respectively 1.67µg/mL and 3.44µg/mL after 24h. Expression levels of *BAX* and *CASP3* increased '2.82 and 4.31' and '1.58 and 4.07' fold in Calu-3 and MRC5, whereas *BCL2* gene expression decreased 0.64 and 0.35-fold in the mentioned cell lines. It is demonstrated that cell migration is inhibited by melittin.

Conclusion: Melittin has an anti-cancer effect on Calu-3 lung cancer cell line. Furthermore, melittin induces apoptosis and inhibits cell migration of lung cancer cells. Melittin increases the apoptotic gene expression level and eventually causes the cells to move toward cell death. In addition, comparing the effects of melittin on Calu-3 cancer cells and MRC5 normal cells, it can be concluded that melittin has inhibitory and apoptotic effects on cancer cells at lower doses.

Keywords: NSCLC, Melittin, apoptosis, *BAX*, *BCL2*, *CASP3*.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

Corresponding author:
Venom and Biotherapeutics Molecules Lab, Medical Biotechnology Dept., Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran
Email: kamranpb@gmail.com

ارزیابی اثرهای ضدسرطانی پپتید ملیتین بر ردۀ سلولی سرطان ریه در شرایط برون‌تنی

پویان هنری[۱]، دلاور شهباززاده[۲]، مهدی بهدانی[۲]، کامران پوشنگ باقری[۲]*

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی‌ومولکولی، دانشکدۀ علوم‌وفناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. آزمایشگاه ونوم، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماران مبتلا به سرطان ریه از نوع سلول‌های سرطانیِ سلول غیرکوچک (NSCLC) دارای پیش‌آگهی پایین بوده و درمان‌های موجود دارای اثرهای جانبی زیادی برای آن‌ها می‌باشد. از طرفی تعداد زیادی از مطالعه‌های اخیر به اثرهای ضدسرطانی پپتید ملیتین پرداخته‌اند. هدف ما از این مطالعه بررسی اثرهای ضدسرطانی ملیتین بر سلول‌های Calu-3 سرطان ریه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: میزان کشندگی توسط ملیتین بر روی دو ردۀ سلولی Calu-3 و MRC5 (به‌عنوان سلول نرمال) با استفاده از آزمون MTT موردارزیابی قرار گرفت. از روش Real-Time PCR برای مشخص شدن بیان‌ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز شامل *BAX*، *BCL2*و *CASP3* استفاده گردید. در نهایت به‌منظور بررسی نقش مهاری ملیتین بر فرآیند مهاجرت سلولی، از روش آزمون ارزیابی مهاجرت سلولی استفاده شده‌است.

یافته‌ها: میزان ۵۰٪ کشندگی (IC_{50}) برای ملیتین برای دو ردۀ سلولی Calu-3 و MRC5 به‌ترتیب ۱/۶۷ µg/mL و ۳/۴۴ µg/mL در ۲۴ ساعت به‌دست آمد. میزان بیان‌ژن‌های *BAX* و *CASP3* در سلول‌های Calu-3، ۲/۸۲ و ۴/۳۱ برابر و در سلول‌های MRC5، ۱/۵۸ و ۴/۰۷ برابر افزایش پیدا کرد، از طرف دیگر بیان‌ژن *BCL2* در سلول‌های Calu-3 ۰/۳۵ برابر و در سلول‌های MRC5 ۰/۶۴ برابر نسبت به گروه تیمارنشده کاهش‌یافتپ. به‌علاوه نتایج حاصل از آزمون ارزیابی مهاجرت سلولی نشان‌دهندۀ مهار فرآیند مهاجرت سلولی توسط ملیتین بود.

نتیجه‌گیری: ملیتین اثرات ضدسرطانی بر روی ردۀ سلولی Calu-3 سرطان ریه نشان می‌دهد. به‌علاوه ملیتین می‌تواند موجب القای آپوپتوز و مهار مهاجرت سلولی در سلول‌های سرطانی ریه گردد. ملیتین با افزایش بیان‌ژن‌های مؤثر در فرآیند آپوپتوز باعث حرکت سلول‌ها به سمت مرگ سلولی می‌گردد. علاوه‌بر این با توجه به مقایسۀ نتایج به‌دست‌آمده از اثرهای ملیتین بر ردۀ سلول سرطانی Calu-3 با ردۀ سلول سالم MRC5 می‌توان نتیجه گرفت که اثرگذاری این پپتید بر سلول‌های سرطانی به‌میزان بالاتر و در دوزهای پایین‌تری صورت می‌گیرد.

واژگان کلیدی: NSCLC، ملیتین، آپوپتوز، *BAX*، *BCL2*،*CASP3*.

مقدمه

سرطان ریه یکی از پیشتازان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد (۱، ۲). دو نوع سرطان ریۀ SCLC و NSCLC وجود دارد که ۸۵٪ از سرطان‌های ریه از نوع NSCLC می‌باشند (۳). آدنوکارسینوما، کارسینوما و کارسینومای سلول‌های موکوزی سه نوع اصلی NSCLC می‌باشند (۴). درمان‌های مختلفی از جمله شیمی‌درمانی، رادیوشیمی‌درمانی، تارگت‌درمانی، ایمنی‌درمانی و درمان‌های ترکیبی برای این نوع از سرطان وجود دارد (۵، ۶). بااین‌حال درمان‌های موجود دارای شانس موفقیت کم و محدودی می‌باشند به نحوی که میزان مدت‌زمان زنده‌ماندن بیماران مبتلا به NSCLC و احتمال موفقیت‌آمیز بودن درمان برای آن‌ها بسیار پایین می‌باشد (۱، ۲). اگرچه در صورت تشخیص

نویسنده مسئول:
آزمایشگاه ونوم، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور، تهران، ایران
پست الکترونیکی: kamranpb@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

این نوع از سرطان در مراحل اولیه، امکان بهبود پیش‌آگهی[1] بیماری با استفاده از عمل جراحی وجود دارد (۷). پپتیدهای ضدسرطانی (ACP)، دسته‌ای از پپتیدها می‌باشند که می‌توانند باعث مهار تکثیر سلولی، مهاجرت، پیشرفت و تهاجم سلولی در سلول‌های سرطانی گردند (۸). همچنین آن‌ها دارای اثرهای جانبی و مقاومت دارویی کمتری نسبت به درمان‌های رایج سرطان‌ها می‌باشند (۹، ۱۱). بااین‌حال این پپتیدها نیز ممکن است دچار تجزیه شده و غیرفعال شوند و یا دارای سمیّت و کشندگی برای سلول‌های نرمال باشند (۱۱). لیتین یکی از پپتیدهای ضدسرطانی می‌باشد که جزء اصلی زهر زنبورعسل بوده و دارای ۲۶ اسیدآمینه و خاصیت آبدوستی می‌باشد (۱۲). این پپتید باعث ایجاد اختلال در عملکرد غشای سلولی، ایجاد ساختار حفرهٔ غشایی و وزیکول های غشایی می‌گردد (۱۳، ۱۴). تاکنون ملیتین خاصیت ضدسرطانی، ضدباکتریایی، ضدمیکروبی و حتی ضدالتهابی در سلول و مدل‌های حیوانی از خود نشان داده‌است (۱۵، ۱۶). این پپتید می‌تواند باعث القای آپوپتوز، توقف چرخهٔ سلولی، مهار رشد و مهاجرت سلولی در چندین سرطان مختلف گردد (۱۹-۱۷). به‌علاوه ملیتین دارای بار مثبت بوده و تمایل بالایی به غشاهای دارای بار منفی دارد. در نتیجه ازآنجایی‌که سلول‌های سرطانی دارای بار منفی بیشتری نسبت به سلول‌های نرمال هستند، ملیتین تمایل بالاتری برای اتصال به غشای این سلول‌ها از خود بروز می‌دهد (۲۰-۲۲). همچنین چندین ژن مهم و مؤثر در فرآیند آپوپتوز از جمله *BAX*، *BCL2*و *CASP3* وجود دارند که می‌توانند کاندیدهای مناسبی به‌منظور بررسی القای این فرآیند در سلول‌های هدف باشند (۵، ۲۳). BAX نیز یک پروتئین پیش‌آپوپتوزی بوده که در کنترل این فرآیند نقش مهمی دارد و معمولاً به شکل هترودایمر با یک پروتئین ضدآپوپتوزیِ دیگری در سیتوپلاسم دیده می‌شود (۵). در شرایط نرمال، میزان بیان‌ژن تولیدکنندهٔ *BAX* بر اثر سیگنال‌های شروع آپوپتوز، افزایش می‌یابد، درحالی‌که بیماران مبتلا به NSCLC دارای بیان پایین‌تری از *BAX* بوده که منجر به مقاومت بیشتر سلول‌های سرطانی به سیسپلاتین (Cisplatin) (داروی ضدسرطانی رایج در درمان سرطان ریه) می‌گردد (۵، ۲۴). BCL2 نیز یک پروتئین ضدآپوپتوزی بوده که توسط ژن‌هایی به‌همین نام بیان می‌شود (۲۵). این پروتئین به علت نقش ویژهٔ تنظیمی خود در فرآیند آپوپتوز شناخته می‌شود که باعث افزایش قدرت زنده‌ماندن سلول‌ها می‌گردد (۲۵، ۲۶). در بیماران مبتلا به NSCLC میزان این پروتئین افزایش می‌یابد که به‌همراه کاهش بیان *BAX* باعث به هم خوردن تعادل در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول‌ها شده و در نهایت حرکت سلول‌ها به سمت سرطانی‌شدن به‌وقوع می‌پیوندد (۵، ۲۶). کاسپاز ۳ (CASP3)یک میانجی در فرآیند آپوپتوز بوده که در شرایط استرس و یا قرار گرفتن در برابر داروها و مواد سمّی، رادیودرمانی و ایمنی‌درمانی افزایش بیان پیدا می‌کند (۲۷). ازآنجایی‌که مقدار بیان پایین این ژن باعث بدتر شدن پیش‌آگهی در بعضی از سرطان‌ها از جمله NSCLC می‌گردد در نتیجه، در بعضی از موارد از این پروتئین به‌عنوان یک مارکر برای بررسی مؤثر بودن درمان برای یک سرطان استفاده می‌شود (۲۷، ۲۸). ا توجه به مطالب بیان‌شده هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدسرطانی ملیتین بر ردهٔ سلولی Calu-3 از سرطان NSCLC و مقایسهٔ اثرگذاری آن بر سلول‌های نرمال ریه می‌باشد. به‌علاوه بررسی عملکرد این پپتید سرطانی بر القای آپوپتوز و مهار مهاجرت سلولی در این نوع از سرطان موردبررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها و محیط‌کشت

ملیتین با توالی
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
و خلوص ۹۷ در صد تو سط شرکت DgPeptides (هانگژو - چین) سنتز و خریداری شد. به‌منظور افزایش پایداری ملیتین، فرآیند آمیداسیون در انتهای C این پپتید اعمال شد. از Mass spectrometry (MS) به‌منظور بررسی وزن مولکولی ملیتین سنتز شده استفاده گردید. تمامی ملیتین‌ها در استوک‌هایی با غلظت ۱ mg/mL تهیه شده و در دمای ۲۰- سلیسوس استفاده نگهداری شدند.

[1] Prognosis

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای انسانی Calu-3 (ATTC number:HTB-55) و نرمال انسانی MRC5 (ATTC number:CCL-171)، از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و پس از انجام تست‌های بررسی آلودگی احتمالی، در محیط‌کشت DMEM (گیبکو، آمریکا) به‌همراه ۱۰ در صد سرم جنین گاوی (FCS) و ۱۰۰µg/mL آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penstrep-400) اضافه‌شده و در دمای ۳۷°C انکوبه شدند.

آزمون MTT

میزان سمیّت ملیتین برای سلول‌های نرمال و سرطانی با استفاده از آزمون MTT موردبررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا ۳×۱۰^{4} سلول درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه بارگذاری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و با توجه به نتایج تحقیقات مشابه در مورد اثرگذاری ملیتین بر سلول‌های سرطانی، سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ µg/mL از ملیتین تیمار شده و به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس ۲۰µL از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در مرحلهٔ بعد مایع رویی دور ریخته شده و ۲۰۰µL از محلول DMSO۱ درصد به هر چاهک اضافه شد. در نهایت میزان جذب نور در ۵۴۰ nm توسط هر چاهک به کمک دستگاه میکروپلیت-ریدر (Biotek, Germany) مورد خوانش قرار گرفت. با توجه به‌میزان خوانش نور توسط دستگاه، درصد سلول‌های زنده‌مانده (Cell Viability) موردمحاسبه قرار گرفت. همچنین تمامی آزمایش‌ها به شکل سه‌گانه و سه بار تکرار نیز انجام شدند.

Real-Time PCR

به این منظور ابتدا ۳×۱۰^{4} سلول درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه بارگذاری و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس غلظت IC_{50} از ملیتین به هرکدام از چاهک‌ها به جز گروه کنترل اضافه شد و دوباره سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه گردیدند. به‌منظور استخراج کل RNA از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در مرحلهٔ بعدی cDNA هر سلول بر اساس RNA استخراج‌شده در مرحلهٔ قبل و با استفاده از کیت سنتز Cdna (یکتا تجهیز آزما، ایران) سنتز گردید. به‌منظور بررسی بیان‌ژن‌های *BAX*، *BCL2* ، *CASP3* و GAPDH (به‌عنوان ژن کنترل)، پرایمرهایی طبق جدول ۱ طراحی شدند. فرآیند Real-Time PCR در ۴۰ سیکل و برای هر سیکل به‌ترتیب جدول ۲ انجام پذیرفت. میزان تغییر بیان‌ژن‌ها با محاسبهٔ میزان Fold Change موردمحاسبه قرار گرفت و میزان بیان تمامی ژن‌ها نسبت به ژن‌های گروه کنترل به‌عنوان رفرنس موردبررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای انتخاب‌شده به‌منظور استفاده در فرآیند Real-Time PCR

ژن	برگشت ('5 → '3)	رفت ('5 → '3)	طول قطعه (bp)
BAX	GGGTGGTTGGGTGAGACTC	AGACACGTAAGGAAAACGCATTA	۱۹۱
BCL2	TCCCTCGCTGCACAAATACTC	ACGACCCGATGGCCATAGA	۷۲
CASP3	AGGACTCTAGACGGCATCCA	CAGTGAGACTTGGTGCAGTGA	۱۲۶
GAPDH	CCACTAGGCGCTCACTGTTC	AGGCGCCCAATACGACCAA	۱۲۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

جدول ۲- دما و مدت‌زمان هر مرحله در هر چرخه از Real-Time PCR

مرحله	درجهٔ حرارت / مدت‌زمان
Initial Denaturation	۵/۹۴ دقیقه C
Denaturation	۳۰/۹۴ ثانیه C
Annealing	۵/۶۱ دقیقه C
Extension	۱/۷۲ دقیقه C
Final Elongation	۵/۷۲ دقیقه C

آزمون خراش زخم

به این منظور ابتدا ۳×۱۰^{۴} سلول درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۲۴ خانه بارگذاری و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ C انکوبه شدند. در ادامه غلظت IC_{50} از ملیتین به هرکدام از چاهک‌ها به جز گروه کنترل اضافه شد و دوباره سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ C انکوبه گردیدند. در این مرحله با کمک سر یک پیپت p200 به آرامی و دقت یک خراش درون هر چاهک ایجاد شد و به‌منظور حذف سلول‌هایی که از کف میکروپلیت جدا شده بودند، مایع محیط‌کشت با محیط‌کشت جدید جایگزین گردید. سپس یک نقطه در هر چاهک مشخص شده و در بازه‌های زمانی ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پهنای خراش ایجادشده در هر سلول موردبررسی و عکس‌برداری با میکروسکوپِ معکوس قرار گرفت. در نهایت عکس‌های گرفته‌شده با استفاده از نرم‌افزار imageJ به شکل داده‌های نیمه‌کمّی درآمدند.

آنالیز آماری

کلیهٔ آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 9 (San Diego, CA, USA) انجام گرفت . به‌علاوه تمامی آزمایش‌ها به شکل سه‌بار تکرار انجام شده‌اند. تفاوت بین گروه تیمارشده و گروه کنترل از طریق one-way ANOVA با p-Value ≤ ۰/۰۵ محاسبه شده‌است.

نتایج

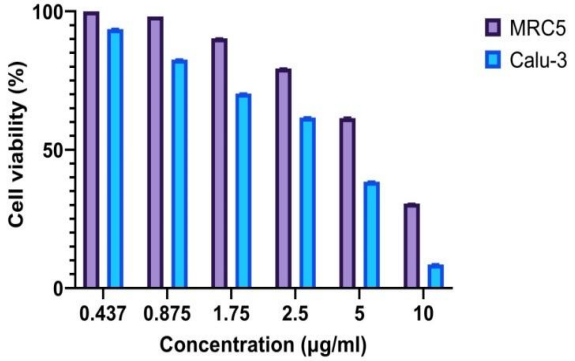
نتایج آزمون MTT

نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون نشان می‌دهد که ملیتین باعث مهار تکثیر سلولی و کاهش درصد زنده‌مانیِ سلول‌های Calu-3 می‌شود (نمودار ۱). همچنین دارای اثر مشابه بر سلول‌های نرمال MRC5 در دوزهای بالاتر می‌باشد. مقدار IC_{50} برای سلول‌های Calu-3 و MRC5 در بازه‌های زمانی متفاوت در جدول ۳ و نمودار ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۳- مقدار IC_{50} برای هر دو ردهٔ سلولی در بازه‌های زمانی متفاوت

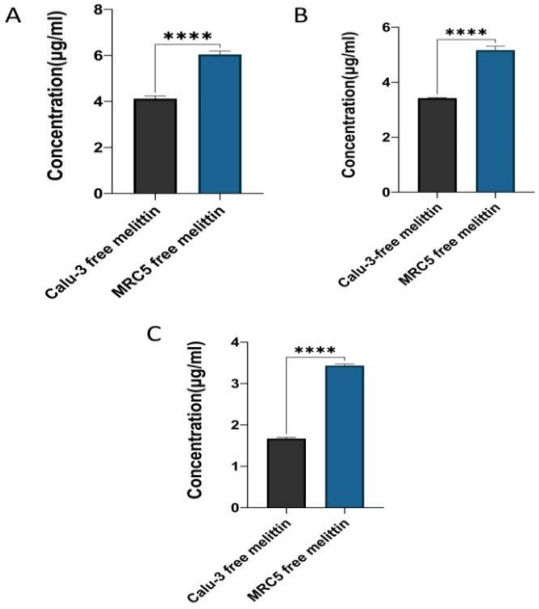
زمان (ساعت)	IC_{50} برای ردG سلولی Calu-3 (µg/mL)	IC_{50} برای ردG سلولی MRC5 (µg/mL)
۲۴	۳/۹	۵/۶۲
۴۸	۳/۴۲	۴/۵۷
۷۲	۱/۶۷	۲/۵۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]



نمودار ۱- نتایج آزمون MTT برای سلول‌های Calu-3 و MRC5 در غلظت‌های مختلف و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار شدن سلول‌ها با ملیتین

با توجه به نمودار ۱، با افزایش غلظت ملیتین به‌کار گرفته‌شده، درصد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد.



نمودار ۲- مقایسهٔ مقدار IC_{50} برای دو ردهٔ سلولی در بازه‌های مختلف زمانی

تفاوت معنادار مقدار IC_{50} برای MRC5 و Calu-3 به‌ترتیب بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار شدن با ملیتین (A)، بعد از ۴۸ ساعت از تیمار شدن با ملیتین (B) و بعد از ۷۲ ساعت از تیمار شدن با ملیتین (C)

**** p-Value ≤ 0.0001

نتایج حاصل از Real-Time PCR به‌منظور مقایسهٔ تغییرات بیان‌ژن‌ها

با توجه به مقدار Ct به‌دست‌آمده برای هر ژن، میزان Fold Change برای ژن‌های *BAX*، *BCL2* و *CASP3* برای رده‌های سلولی مورد بررسی محاسبه گردید. مقدار این فاکتور در جدول ۴ به تفکیک برای هر ژن و هر سلول نشان داده شده‌است. با توجه به‌میزان p-value محاسبه‌شده که کمتر از ۰/۰۰۰۱ می‌باشد، نشان داده شده‌است که میزان تغییر بیان‌ژن‌های هدف در سلول‌های سرطانی Calu-3 نسبت به میزان تغییرات همین ژن‌ها در سلول‌های نرمال MRC5 دارای رابطهٔ معناداری می‌باشند.

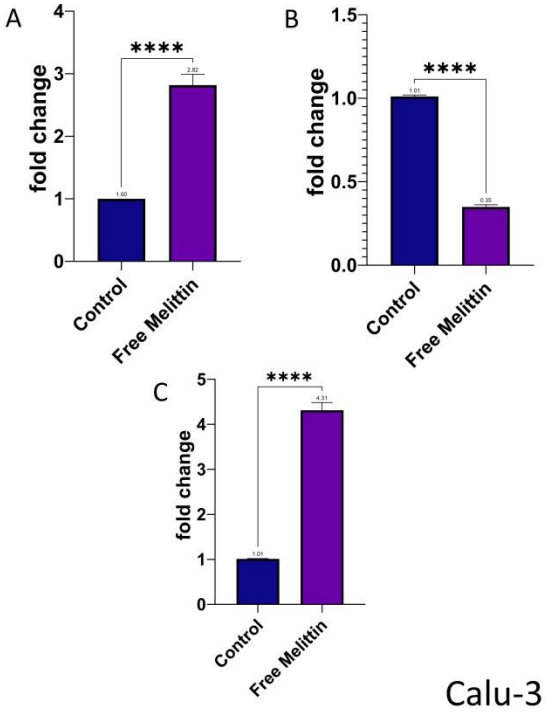
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

جدول ۴- مقایسهٔ مقدار تغییرات بیان‌ژن‌های هدف (Fold Change) در دو ردهٔ سلولی MRC5 و Calu-3.

ردهٔ سلولی	*BAX*	*BCL2*	*CASP3*
Calu-3	۲/۸۲	۰/۳۵	۴/۳۴
MRC5	۳/۵۸	۰/۶۴	۴/۰۷

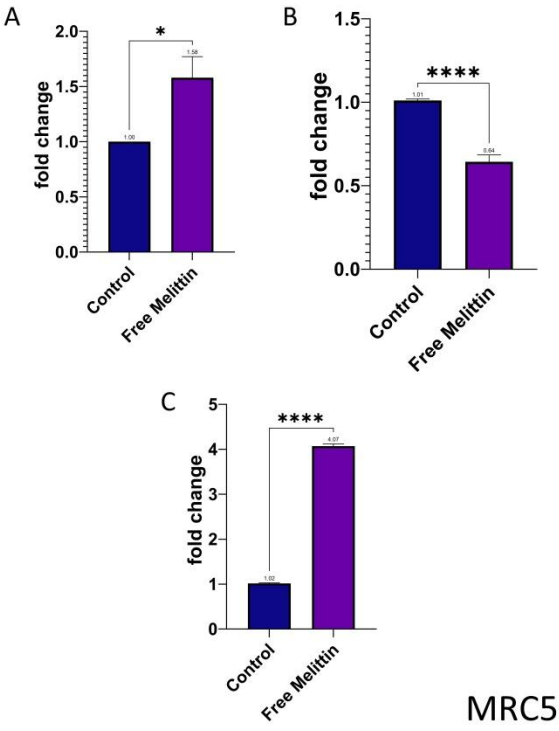
*** **p-Value ≤ 0.0001**

افزایش میزان ژن‌های القاکنندهٔ آپوپتوز در هر دو ردهٔ سلولی مشخص می‌باشد. نمودار ۳ نشان‌دهندهٔ کاهش بیان‌ژن *BCL2* و افزایش بیان‌ژن‌های *CASP3* و *BAX* در سلول‌های تیمارشده با ملیتین می‌باشد.



نمودار ۳- مقایسهٔ بیان‌ژن‌های *BAX* (A)، *BCL2* (B) و *CASP3* (C) در ردهٔ سلولی Calu-3

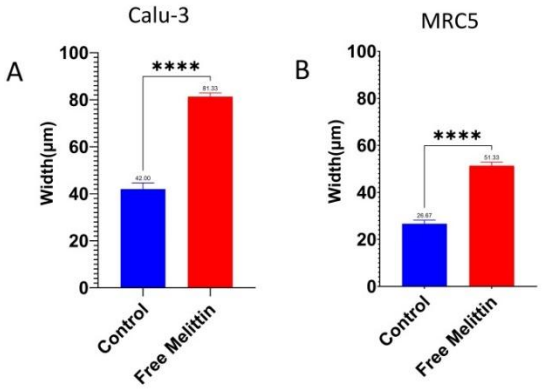
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]



نمودار ۴- مقایسهٔ بیان‌ژن‌های *BAX* (A)، *BCL2* (B) و *CASP3* (C) در ردهٔ سلولی MRC5

نتایج آزمون خراش زخم

از این آزمون به‌منظور بررسی اثر مهاری ملیتین آزاد بر مهاجرت و تهاجم سلول‌های هدف، استفاده شد. میزان قدرت مهاجرت سلولی در سلول‌های Calu-3 و MRC5 تیمارشده با ملیتین نسبت به سلول‌های گروه کنترل کاهش پیدا کرد (نمودار ۵). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که سلول‌هایی که با ملیتین تیمارشده بودند، نیاز به زمان بیشتری برای پُر کردن جای خراش و ترمیم زخم نسبت به سلول‌های تیمارنشده داشتند.



نمودار ۵- مهار مهاجرت سلولی توسط ملیتین
شکل (A) اثر مهاری ملیتین آزاد بر مهاجرت سلولی سلول‌های Calu-3. شکل (B) اثر مهاری ملیتین آزاد بر مهاجرت سلولی سلول‌های MRC5

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

با توجه به‌میزان باقی‌مانده از پهنای زخم که در گروه MRC5 کمتر از سلول‌های Calu-3 می‌باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که اثر مهاری ملیتین بر ردهٔ سلولی سرطانی از سلول‌های نرمال بیشتر می‌باشد.

بحث

با توجه به‌میزان موفقیت کم و اثرهای جانبی زیاد درمان‌های رایج برای بیماران مبتلا به NSCLC، نیاز به یک استراتژی درمانیِ جدید به‌خوبی احساس می‌شود (۱). پپتیدهای ضدسرطانی یکی از این رویکردهای جدید درمانی هستند که می‌توانند به این منظور به‌کار برده شوند (۱۰). ملیتین نیز یکی از پپتیدهای ضدسرطانی موجود با توانایی بالقوه برای ایجاد اختلال در روند کار سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۲). همان‌طورکه اشاره شد ملیتین به غشاهای دارای بار منفی متصل‌شده و این فرآیند با اتفاقاتی نظیر ایجاد ساختار حفرهٔ غشایی، نشت مواد حیاتی به بیرون از سلول‌ها و افزایش نفوذپذیری سلول‌ها همراه می‌شود که تمام این موارد در نهایت منجر به بر هم خوردن تعادل غشا و لیز سلولی می‌گردد (۱۶، ۲۹). ازآنجایی‌که غشای سلول‌های سرطانی دارای بار منفی بیشتری نسبت به سلول‌های نرمال می‌باشد، در نتیجه ملیتین می‌تواند کاندید مناسبی به‌عنوان یک راهکار درمانی برای سرطان‌ها به‌کار رود (۱۹).

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، غلظت پایین‌تری از ملیتین می‌تواند باعث کاهش قدرت زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال ریه گردد، به‌نحوی که در میزان غلظت ۰/۴۳۷ µg/mL از ملیتین، درصد زنده‌ماندن سلول‌های نرمال MRC5 تغییر معناداری نکرده اما سلول‌های سرطانی ریه شروع به از بین رفتن می‌نمایند (نمودار ۱) که علت این موضوع احتمالاً به بار منفیِ بیشتر غشای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال بستگی داشته که باعث جذب و حملهٔ بیشتر ملیتین به این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های نرمال ریه می‌شود؛ هرچند بررسی دقیق علل این پدیده نیاز به مطالعات بیشتر و مجزایی دارد. با مقایسهٔ نتایج حاصل‌شده از این مطالعه و موارد به‌دست‌آمده از مطالعهٔ Yu و همکاران (۳۱) و همچنین مطالعهٔ دیگری توسط Zhang (۳۲) و باوجوداینکه نوع ردهٔ سلولیِ به‌کار رفته در این دو مطالعه از نوع A549 می‌باشد باز هم نزدیکیِ قابل‌توجهی بین نتایجِ حاصل‌شده، وجود دارد. ضمن اینکه در تمام موارد اثر ملیتین بر سلول‌های نرمال و گروه کنترل مشابه و نزدیک به یکدیگر بوده‌است. به‌علاوه داده‌های به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که میزان اثرهای سمّی ملیتین بر سلول‌های نرمال پایین‌تر از سلول‌های سرطانی می‌باشند. به عبارت دیگر با توجه به‌مقدار IC_{50} محاسبه‌شده که برای سلول‌های Calu-3 و MRC5 به‌ترتیب مقدار ۳/۹ و ۵/۶۲ محاسبه شده‌است، نشان می‌دهند که میزان غلظت بالاتری از ملیتین برای ایجاد اثرهای منفی بر سلول‌های نرمال نسبت به سلول‌های سرطانی لازم می‌باشد که این موضوع می‌تواند نویدبخش پیدا کردن یک دوز غیرسمّی از ملیتین برای سلول‌های نرمال ریه باشد. درحالی‌که همین مقدار دوز باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌گردد. به‌علاوه نتایج نشان دادند که با گذشت زمان بیشتر، به غلظت کمتری از ملیتین برای از بین بردن سلول‌های موردمطالعه نیاز می‌باشد به‌طوری‌که میزان IC_{50} برای سلول‌های Calu-3 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب میزان µg/mL ۳/۹، ۳/۴۲، ۱/۶۷ و برای سلول‌های MRC5 به‌ترتیب µg/mL ۵/۶۳، ۴/۵۷ و ۲/۵۶ محاسبه شده‌است که در هر دو مورد روند کاهشی از خود نشان می‌دهد. از مقایسهٔ این اعداد به‌دست‌آمده با مطالعهٔ Yu (۳۱) و همچنین مطالعهٔ Zhang (۳۲) می‌توان مشاهده نمود که میزان اثرپذیری سلول‌های سرطانی Calu-3 در مقایسه با سلول‌های سرطانی A549 نسبت به ملیتین مورداستفاده، بیشتر می‌باشد یعنی به‌عنوان مثال سلول‌های A549 به‌کار رفته در مطالعهٔ ژانگ در غلظت‌های بالاتری از ملیتین مورداستفاده (بیش از ۲µg/mL) شروع به کاهش درصد سلول‌های زنده‌مانده کرده و در نتیجه دارای میزان IC_{50} بالاتری نسبت به سلول‌های Calu-3 مورداستفاده در مطالعهٔ حاضر بودند.

همچنین مسیر خارجی آپوپتوز توسط آبشارهای کاسپازی که در نهایت با مشارکت کاسپاز-۳ همراه است، فعال می‌شود که در نهایت این فرآیند منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA و فشرده‌شدن هستهٔ سلول‌ها می‌شوند (۲۷). همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ملیتین آزاد می‌تواند باعث افزایش میزان کاسپاز-۳ در سلول‌های سرطان‌هایی چون پستان و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

پروستات گردند (۱۴). میزان بیان‌ژن‌های آپوپتوزی و پروآپوپتوزی *BAX* و *CASP3* بعد از تیمار شدن با ملیتین به‌ترتیب به‌میزان ۲/۸۲ و ۴/۸۱ در سلول‌های Calu-3 و ۳/۵۸ و ۴/۰۷ در سلول‌های MRC5 افزایش یافته بود و در طرف مقابل میزان بیان‌ژن ضدآپوپتوزی *BCL2* به‌میزان ۰/۳۵ و ۰/۶۴ برابر، کاهش پیدا کرده بود. این موارد حاکی از القای آپوپتوز توسط ملیتین در سلول‌های موردمطالعه می‌باشد. به‌علاوه میزان افزایش و کاهش این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی Calu-3 از سلول‌های نرمال MRC5 بیشتر بود که نشان‌دهندهٔ مقاومت بیشتر سلول‌های نرمال نسبت به ملیتین می‌باشد. ازطرف‌دیگر با بررسی نتایج حاصل از مطالعهٔ Zhang (۳۲) بر روی ردهٔ سلولی A549 سرطان ریه که میزان تغییرات بیان‌ژن‌ها *BAX* و *BCL2* را به‌ترتیب ۱/۳ و ۰/۳ گزارش کرده بودند، با اعداد به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان به حساسیت بیشتر ردهٔ سلولی Calu-3 به‌علت فرم ساختار کروی و توده‌ای و دیوارهٔ سلولی متفاوت نسبت به ملیتین در مقایسه با ردهٔ سلولی A549 اشاره نمود. به‌علاوه در مطالعهٔ Yu (۳۱) بر روی اثرهای ضدسرطانی ملیتین بر روی ردهٔ سلولی A549 میزان تغییرات بیان‌ژن *CASP3* مقدار ۲/۸۷ گزارش شده‌است که نسبت به مطالعهٔ حاضر بر روی ردهٔ سلولی Calu-3 مقدار کمتری را نشان می‌دهد که باز هم می‌تواند گواه بر اثرپذیری بیشتر این ردهٔ سلولی نسبت به ردهٔ سلولی A549 در برابر ملیتین باشد. فرآیند مهاجرت و تهاجم سلولی در سلول‌های سرطانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد، زیرا فرآیند متاستاز سلول‌های سرطانی که در نهایت به مرگ بیماران منتهی می‌شود، نیازمند قدرت مهاجرت سلولیِ فعال سلول‌های سرطانی می‌باشد (۳۰، ۳۱). در این مطالعه نشان داده شد که ملیتین می‌تواند باعث مهار فرآیند مهاجرت سلولی در هر دو ردهٔ سلولی گردد. میزان درصد ترمیم زخم در سلول‌های Calu-3 و MRC5 بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار شدن با ملیتین به‌ترتیب ۳۲ درصد و ۴۵ درصد مورد محاسبه قرار گرفت. به‌علاوه نشان داده شد که میزان مهار توانایی مهاجرت سلولی توسط ملیتین در سلول‌های سرطانی بیشتر از سلول‌های نرمال می‌باشد. علاوه‌بر موارد گفته‌شده، از مقایسهٔ نتایج حاصل از این مطالعه با پژوهش Yu (۳۲) و Zhang (۳۳) بر روی ردهٔ سلولی A549 سرطان ریه که در آن‌ها میزان ترمیم زخم بعد از ۷۲ ساعت ۴۰ درصد گزارش شده بود، می‌توان مشاهده نمود که با وجود تفاوت در ردهٔ سلولی انتخاب‌شده نتایج به‌دست‌آمده دارای نزدیکیِ قابل‌توجهی هستند، هرچند باز هم میزان اثرپذیری ردهٔ سلولی Calu-3 مورد مطالعه در این مقاله در مقایسه با ردهٔ سلولی A549 نسبت به ملیتین بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه این مطالعهٔ اولیه نشان می‌دهد که ملیتین می‌تواند به‌عنوان یک پیش‌دارو (Drug Lead) برای درمان بیماران مبتلا به NSCLC موردمطالعه قرار گیرد. به‌علاوه نشان داده شد که اثرگذاری ملیتین بر سلول‌های سرطانیِ ریه بیشتر از سلول‌های نرمال می‌باشد. همچنین شایان ذکر است که برای اولین‌بار در این مطالعه به بررسی اثرهای ضدسرطانی ملیتین بر روی ردهٔ سلولی Calu-3 از سرطان ریه و همچنین اثرهای جانبی و آپوپتوزی این پپتید بر روی ردهٔ سلول نرمال MRC5 ریه پرداخته شده‌است. بااین‌حال به‌منظور غلبه بر اثر سمّی ملیتین بر سلول‌های نرمال می‌بایست استفاده از حامل‌ها یا ایجاد تغییراتی در توالی آمینواسیدیِ ملیتین‌ها را موردنظر قرار داد. به‌علاوه می‌بایست آزمایش‌های درون‌تنی نیز به‌منظور بررسی اثرهای این پپتید سرطانی بر روی سلول‌های سرطانیِ ریه انجام گیرد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافعی ندارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

منابع

1. Guo Q, Liu L, Chen Z, Fan Y, Zhou Y, Yuan Z, et al. Current treatments for non-small cell lung cancer. Front Oncol. 2022;12:945102. doi: 10.3389/fonc.2022.945102.
2. Diebels I, Van Schil PEY. Diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer: current advances and challenges. J Thorac Dis. 2022;14(6):1753-7. doi: 10.21037/jtd-22-364.
3. Liu M, Zhao W, Li S, Chen L, Zhou C. Current status of diagnosis and treatment of advanced non-small cell lung cancer in China during the COVID-19 pandemic. Ann Palliat Med. 2022;11(4):1231-40. doi: 10.21037/apm-21-72.
4. Ozcan G, Singh M, Vredenburgh JJ. Leptomeningeal Metastasis from Non-Small Cell Lung Cancer and Current Landscape of Treatments. Clin Cancer Res. 2023;29(1):11-29. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1585.
5. Alam M, Alam S, Shamsi A, Adnan M, Elasbali AM, Al-Soud WA, et al. Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway: Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. Front Oncol. 2022;12:869672. doi: 10.3389/fonc.2022.869672.
6. Ruiz-Ceja KA, Chirino YI. Current FDA-approved treatments for non-small cell lung cancer and potential biomarkers for its detection. Biomed Pharmacother. 2017;90:24-37. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.018.
7. Zarogoulidis P, Matthaios D, Kosmidis C, Hohenforst-Schmidt W, Tsakiridis K, Mpaka S, et al. Effective early diagnosis for NSCLC: an algorithm. Expert Rev Respir Med. 2021;15(11):1437-45. doi: 10.1080/17476348.2021.1969916.
8. Ghaly G, Tallima H, Dabbish E, Badr ElDin N, Abd El-Rahman MK, Ibrahim MAA, et al. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. Molecules. 2023;28(3). doi: 10.3390/molecules28031148.
9. Xie M, Liu D, Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. Open Biol. 2020;10(7):200004. doi: 10.1098/rsob.200004.
10. Zhang Y, Wang C, Zhang W, Li X. Bioactive peptides for anticancer therapies. Biomater Transl. 2023;4(1):5-17. doi: 10.12336/biomatertransl.2023.01.003.
11. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. Molecules. 2020;25(12). doi: 10.3390/molecules25122850.
12. Ullah A, Aldakheel FM, Anjum SI, Raza G, Khan SA, Tlak Gajger I. Pharmacological properties and therapeutic potential of honey bee venom. Saudi Pharm J. 2023;31(1):96-109. doi: 10.1016/j.jsps.2022.11.008.
13. Zarrinnahad H, Mahmoodzadeh A, Hamidi MP, Mahdavi M, Moradi A, Bagheri KP, et al. Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian Honey Bee Venom on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. Int J Pept Res Ther. 2018;24(4):563-70. doi: 10.1007/s10989-017-9641-1.
14. Liu CC, Hao DJ, Zhang Q, An J, Zhao JJ, Chen B, et al. Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment. Cancer Chemother Pharmacol. 2016;78(6):1113-30. doi: 10.1007/s00280-016-3160-1.
15. Guha S, Ferrie RP, Ghimire J, Ventura CR, Wu E, Sun L, et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. Biochem Pharmacol. 2021;193:114769. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114769.
16. Hider RC, Khader F, Tatham AS. Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. Biochim Biophys Acta. 1983;728(2):206-14. doi: 10.1016/0005-2736(83)90473-x.
17. Kwon NY, Sung SH, Sung HK, Park JK. Anticancer Activity of Bee Venom Components against Breast Cancer. Toxins (Basel). 2022;14(7). doi: 10.3390/toxins14070460.
18. Mahmoodzadeh A, Zarrinnahad H, Bagheri KP, Moradia A, Shahbazzadeh D. First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. J Chin Med Assoc. 2015;78(10):574-83. doi: 10.1016/j.jcma.2015.06.008.
19. Soliman C, Eastwood S, Truong VK, Ramsland PA, Elbourne A. The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer. PLoS One. 2019;14(10):e0224028. doi: 10.1371/journal.pone.0224028.
20. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. Cancer Lett. 2017;402:16-31. doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.010.
21. Bae S, Gu H, Gwon MG, An HJ, Han SM, Lee SJ, et al. Therapeutic Effect of Bee Venom and Melittin on Skin Infection Caused by Streptococcus pyogenes. Toxins (Basel). 2022;14(10). doi: 10.3390/toxins14100663.
22. Tarokh Z, Naderi-Manesh H, Nazari M. Towards prostate cancer gene therapy: Development of a chlorotoxin-targeted nanovector for toxic (melittin) gene delivery. Eur J Pharm Sci. 2017;99:209-18. doi: 10.1016/j.ejps.2016.12.021.
23. Yoo J, Kim CH, Song SH, Shim BY, Jeong YJ, Ahn MI, et al. Expression of caspase-3 and c-myc in non-small cell lung cancer. Cancer Res Treat. 2004;36(5):303-7. doi: 10.4143/crt.2004.36.5.303.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]

24. Ali D, Tripathi A, Al Ali H, Shahi Y, Mishra KK, Alarifi S, et al. ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells. Onco Targets Ther. 2018;11:489-97. doi: 10.2147/OTT.S140358.
25. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death Dis. 2019;10(3):177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6.
26. Knight T, Luedtke D, Edwards H, Taub JW, Ge Y. A delicate balance - The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. Biochem Pharmacol. 2019;162:250-61. doi: 10.1016/j.bcp.2019.01.015.
27. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. Int J Cancer. 2018;143(4):921-30. doi: 10.1002/ijc.31374.
28. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020;1867(6):118688. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118688.
29. Shaposhnikova VV, Egorova MV, Kudryavtsev AA, Levitman M, Korystov Yu N. The effect of melittin on proliferation and death of thymocytes. FEBS Lett. 1997;410(2-3):285-8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00578-4.
30. Tahtamouni L, Ahram M, Koblinski J, Rolfo C. Molecular Regulation of Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. Anal Cell Pathol (Amst). 2019;2019:1356508. doi: 10.1155/2019/1356508.
31. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. Br J Cancer. 2021;124(1):102-14. doi: 10.1038/s41416-020-01149-0.
32.Yu R, Wang M, Wang M, Han L. Melittin suppresses growth and induces apoptosis of non-small-cell lung cancer cells via down-regulation of TGF-beta-mediated ERK signal pathway. Braz J Med Biol Res. 2020;54(2):e9017.
33. Zhang Y, Wang C, Zhang W, Li X. Bioactive peptides for anticancer therapies. Biomater Transl. 2023;4(1):5-17.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-08]