NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/50 , 2023

Scan online to view this article

The effect of a recombinant immunotoxin containing ricin toxin on the expression of apoptotic genes *BAX* and *BCL-2* in colorectal and breast cancer cell lines

Azam Almolok Naemi[1], Ali Hatef Salmanian[2*], Zahra Noormohammadi[1], Jafar Amani[3]

1. Biology department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3. Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and background: Cancer is mainly caused by defect in natural regulation of programmed cell death (PCD). On the other hand, it is proved that, the EGFR is overexpressed on the surface of many malignant cell. Therefore, immunotoxin against EGFR, which consisting an antibody or fragment of an antibody linked to the toxic moiety is one of the most reliable strategies for cancer treatment. Here we evaluate the effect of a novel immunotoxin molecule harboring ricin, as a toxic moiety on the mRNA level of two main apoptotic molecules on cancerous cell lines.

Materials and method: The Effects of immunotoxin molecule and it's components including ricin toxin and antibody fragment on the mRNA level of pro- apoptotic *BAX* and anti-apoptotic *BCL-2* and EGF receptor genes on the breast MDA-MB-468 and colorectal HCT-116 cancer cell lines were assayed by qRT-PCR. We used glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a reference gene.

Results: Treatment with immunotoxin significantly increased the expression of *BAX* gene and decreased the expression of *EGFR* and *BCL-2* genes ($P<0.05$) and induced apoptosis. Also, ricin toxin caused a significant decrease in *BCL-2* and no significant increase in *BAX* in cancer cells and decreased *EGFR* only in breast cancer cells. The scFv part had no significant changes on genes expression.

Conclusion: The present findings showed that the recombinant Panitumumab-Ricin protein, may be an appropriate candidate for the treatment of EGFR overexpressed cancers by induction in apoptosis pathway.

Key words: Immunotoxin, Antibody, Apoptosis, Epidermal growth factor receptor,.Iau Science

Corresponding author:
Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
Email: salman@nigeb.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره ۵۰ - بهار ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی تأثیر ایمونوتوکسین نوترکیب حاوی سم ریسین بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی *BAX* و *BCL-2* در رده‌های سلولی سرطان کلورکتال و پستان

اعظم الملوک ناعمی[۱]، علی هاتف سلمانیان[۲*]، زهرا نورمحمدی[۱]، جعفر امانی[۳]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی،تهران، ایران
۲. گروه زیست فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، پژوهشکده سیستم بیولوژی مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سرطان به‌طور عمده به‌دلیل اختلال در تنظیم مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده است. از طرفی بیان بیش از حد[۱] EGFR بر روی سطح بسیاری از سلول‌های بدخیم ثابت شده است. از این‌رو ایمونوتوکسین[۲] بر علیه EGFR، که حاوی یک آنتی‌بادی یا یک قطعه از آنتی‌بادی متصل شده به یک مولکول سمی است، از قابل اعتمادترین راهبردها برای درمان سرطان است. در اینجا ما تأثیر یک مولکول جدید ایمونوتوکسین حاوی سم ریسین[۳] بر روی سطح mRNA دو مولکول اصلی آپوپتوز در رده‌های سلول‌های سرطانی را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها: تأثیر مولکول ایمونوتوکسین و اجزاء آن شامل سم ریسین و قطعه آنتی‌بادی بر روی سطح mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک *BAX* و آنتی‌آپوپتوتیک *BCL-2* و ژن گیرنده *EGF*، در رده سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-468 و کلورکتال HCT116 با استفاده از (qRT-PCR)[۴] انجام شد. از گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

یافته‌ها: تیمار با ایمونوتوکسین موجب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بیان ژن *BAX* و کاهش بیان ژن‌های *EGFR* و *BCL-2* و القاء آپوپتوز شد. هم‌چنین سم ریسین باعث کاهش معنی‌دار *BCL-2* و عدم افزایش معنی‌دار *BAX* در سلول‌های سرطانی و کاهش معنی‌دار *EGFR* تنها در سلول‌های سرطان پستان شد. بخش scFv[۵] تغییرهای معنی‌داری بر بیان ژن‌ها نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب پانیتومومب-ریسین، می‌تواند کاندید مناسب برای درمان سرطان‌هایی با بیان بیش از حد عامل رشد اپیدرمی به‌وسیله القاء مسیر آپوپتوز باشد.

واژگان کلیدی: ایمونوتوکسین، آنتی‌بادی، آپوپتوز، گیرنده عامل رشد اپیدرمی، Iau Science.

نویسنده مسئول:
گروه زیست فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی،
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
پست الکترونیکی: salman@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۴

[1] Epidermal Growth Factor Receptor
[2] Immunotoxin
[3] Ricin Toxin
[4] Real time quantitative PCR
[5] Single Chain Fragment Variable

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

مقدمه

سرطان دسته ای از بیماری‌هاست که به‌وسیله رشد سلولی کنترل نشده مشخص می‌شود. سرطان کلورکتال سومین عامل مرگ و میر بر اثر سرطان در سراسر جهان است که شیوع آن در کشورهای توسعه یافته رو به افزایش است (۱). علاوه‌بر سرطان کلورکتال سرطان پستان نیز با نرخ بروز ۱۰/۴٪ از کل سرطان‌ها از شایعترین سرطان‌های جهان است(۲).

از دست دادن تنظیم تقسیم سلولی به‌طور معمول به‌دلیل، اختلال در مسیر انتقال سیگنال یا در فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است، که مسئول حذف طبیعی سلول تحت شرایط فیزیولوژیکی در نظر گرفته می‌شود. دو نوع مرگ برنامه‌ریزی شده تا به حال پیشنهاد شده (۳) که شامل آپوپتوز و اتوفاژی است.

آپوپتوز از طریق دو مسیر درونی و بیرونی رخ می‌دهد. مسیر درونی یا میتوکندریایی، با آزاد سازی سیتوکروم c از میتوکندری همراه است. که منجر به فعال شدن کاسپازها می‌شود. این فرآیند توسط اعضای خانواده ژن *BCL-2*، شامل پرو آپوپتوتیک‌ها (*BAX, BID, BAK, BAD*) و ضد آپوپتوتیک‌ها (*Bcl-XL, BCL-2*) کنترل می‌شود (۵،۴). آزاد سازی سیتوکروم c از میتوکندری فعالیت کاسپاز ۹ آغازگر را شروع می‌کند، که باعث فعال شدن سایر مولکول-های کاسپاز نظیر کاسپاز ۳ و ۷ به‌عنوان effector) caspases 3,7) می‌شود (۶). تنظیم‌های هر دو مسیر درونی و بیرونی آپوپتوز به‌طور کامل وابسته‌به یکدیگر انجام می-شود. هم‌چنین این مسیر می‌تواند توسط مهارکننده‌های آپوپتوز نظیر (XIAP) که فعالیت آنزیمی کاسپازها را مهار می‌کند کنترل شده و تجزیه پروتئوزومی را آغاز کند (۷).

یکی از مسیرهای سیگنالینگ مهم که نقش آن در هدف-گیری گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)[6] به‌خوبی درک نشده، مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است (۸). لذا نحوه مهار EGFR توسط مسیر آپوپتوز با استفاده از یک پروتئین نوترکیب در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعه‌های گذشته نشان داده است که بیان بیش از حد ژن‌های خاص یا تغییرهای ژنتیکی آن‌ها می‌تواند با تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در بقاء، تکثیر و متاستاز منجر به سرطان شوند (۹). EGFR بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۷ (7p11.2)، حاوی ۲۸ اگزون و کد کننده یک پروتئین ۱۲۱۰ آمینو اسیدی است (۱۱،۱۰). EGFR یک پروتئین ترا غشایی است که اتصال لیگاند به ناحیه خارج سلولی آن باعث فعال شدن بخشِ تیروزین کینازی می‌شود. این مولکول در سلول‌های طبیعی، فعال کننده تعداد زیادی از فرآیندهای مهم نظیر رشد، نمو و تمایز است. اما این مولکول در سلول‌های دگرگون شده، بسیاری از پیام‌های غیر عادی را از طریق یک آبشار شبکه‌ای پیام‌رسانی منجر به کارسینوژنز رهبری می‌کند (۱۲). اعضای خانواده گیرنده عامل رشد اپیدرمی (EGFR) از برجسته‌ترین اهداف مولکولی سرطان تا به امروز است. اعضای خانواده EGFR/ErbB شامل: پروتئین‌های EGFR (ErbB1/HER1)، HER2 (neu/ErbB2)، ErbB3 (HER3)،ErbB4 (HER4) (۱۳)و EGFR در سرطان‌های زیادی بیان بیش از حد دارند (۱۴).

علیرغم موفقیت بالینی آنتی‌بادی‌های تک دودمانی (mAbs)[7] با کاربرد درمان، آنتی‌بادی‌های تنها[8]، که آنتی-ژن‌های سطحی سلول توموری را هدف‌گیری می‌کنند، به اندازه کافی در درمان مؤثر نیستند، به‌همین دلیل به‌طور معمول هم‌زمان در ترکیب با شیمی درمانی استفاده می-شوند (۱۵). چندین رویکرد برای حل کردن این مشکل توسعه یافته است که، یکی از این رویکردها ارتقاء قدرت آنتی‌بادی تک دودمانی یا قطعه‌های آنتی‌بادی به‌وسیله اتصال آن‌ها به یک بخش سمی است. سم‌های باکتریایی و گیاهی که بعد از ورود به سلول باعث کشندگی سلولی و مهار سنتز پروتئین می‌شوند کاندیدهای خوبی برای این منظور هستند، در این زمینه سمومی نظیر سودوموناس اگزوتوکسین A (PE)[9]، سم ریسین (RT)[10] بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سموم در مقادیر خیلی کم هم بسیار قوی و فعال هستند، به‌طوری‌که با حضور تنها یک مولکول در سیتوپلاسم نیز امکان کشتن سلول را دارند

[6] Epidermal Growth Factor Receptor

[7] Monoclonal Antibody
[8] Naked Antibody
[9] Pseudomonas Exotoxin A
[10] Ricin Toxin

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

(۱۶). اگرچه ایمونوگلوبولین G (IgG) به‌کار رفته در ایمونوتوکسین‌ها با طول کامل، نیمه عمر خوب (۱۰ تا ۲۱ روز برحسب ایزوتایپ آن و ویژگی‌های منطقه متغیر) (۱۷) و عملکرد مؤثری در شرایط برون تنی دارد، اما اندازه بزرگ آنتی‌بادی نفوذ به درون بافت را به‌ویژه در تومورهای جامد محدود کرده و فرآیند تولید را نیز پیچیده می‌نماید (۱۸). آنتی‌بادی تک دودمانی پانیتومومب anti-EGFR دارای تأییدیه FDA برای درمان سرطان‌های کلورکتال و سر و گردن است (۱۹). هم‌چنین سم ریسن یک پروتئین غیر فعال کننده ریبوزومی (RIP)[11] است که شامل دو زنجیره است که با باند دی‌سولفیدی به‌هم متصل می‌شوند، زنجیره A ناحیه کاتالیتیکی و زنجیره B لکتین با قابلیت اتصال به گالاکتوز بر روی سطح سلول‌ها است (۲۰).

در مطالعه حاضر از روش DNA نوترکیب استفاده گردید تا بخش زنجیره تکی قطعه متغیر آنتی‌بادی (scFv)[12] پانیتومومب به زنجیره A سم ریسین (RTA) Ricin Toxin A chain الحاق شود. پس از بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب مجاورت سلول‌های حاضر با این پروتئین نوترکیب بیان دو ژن کلیدی، *BCL-2* که باعث زنده مانی سلول به‌وسیله مهار آپوپتوز می‌شود و در تضاد با آن ژن پروآپوپتوتیک *BAX* که باعث افزایش آپوپتوز از طریق نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری می‌شود هم‌چنین بیان ژن *EGFR* ارزیابی شد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ایمونوتوکسین مبتنی‌بر سم ریسین ضد *EGFR*، بر روی بیان ژن‌های کلیدی *BAX* و *BCL-2* در مسیر آپوپتوز و مرگ رده‌های سلولی سرطان کلورکتال و پستان است.

مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی و شرایط کشت سلول

رده‌های سلولی سرطان کلورکتال HCT-116 (ATCC No. CCL-247) و سرطان پستان سه‌گانه منفی MDA-MB-468 (ATCC No. HTB-132) و کلیوی جنین انسانی HEK-293 (ATCC No. CRL-1573) از انستیتو پاستور ایران-تهران تهیه شدند. سلول‌های HCT-116 و MDA-MB-468 به‌عنوان سلول‌های با بیان بالای *EGFR* و سلول‌های HEK-293 به‌عنوان سلول نرمال استفاده شدند. محیط کشت RPMI164 برای سلول‌های HCT-116 و MDA-MB-468 و محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL, USA) برای سلول‌های HEK-293 استفاده شدند. هر دو محیط کشت شامل استرپتومایسین (۵۰ µg/ml)، پنی‌سیلین (۵۰ $U.mL^{-1}$) و گلوتامین و (۳۰۰ µg/ml) و ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS; Sigma-Aldrich, UK) بودند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم بیش از ۸۰ درصد پاساژ داده شده، توسط تریپسین از روی فلاسک کنده شده و شمارش سلولی توسط هموسیتومتر انجام شد. در نهایت، سلول‌ها با پروتئین‌های ایمونوتوکسین و پانیتومومب (scFv) با غلظت۰/۷ µg/m برای سلول‌های سرطانی و ۱۰ µg/mL برای سلول کنترل، پروتئین RTA با غلظت ۱۱/۵ µg/mL برای سلول‌های سرطانی و ۲/۵ µg/mL برای سلول کنترل به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار و بیان ژن‌های مورد نظر قبل و بعد از تیمار بررسی شدند (۲۱) (پروتئین‌ها از شرکت تحقیقاتی ژن سبز زیست نوترکیب (ایران-تهران) خریداری شدند).

استخراج RNA کامل

RNA کامل از حدود 10^8 سلول با استفاده از کیت (Sigma-Aldrich Darmstadt, Germany) استخراج شد. مقدار RNA yields توسط اسپکترفوتومتر تعیین شد. کیفیت و کمیت RNA توسط نسبت ۲۶۰A/۲۸۰A بررسی و ژل آگارز برای ملاحظه باندهای مختلف RNA (18S و rRNA 28S) استفاده شد. مقدار ۲ میکروگرم از RNA کامل با درجه خلوص $A_{۲۶۰/۲۸۰} \geq ۲$ با استفاده از کیت ساخت cDNA، iScript (Bio-Rad, Hercules, USA) رونویسی معکوس شد و cDNA آن ساخته شد.

[11] Ribosome Inactivating Protein
[12] Single Chain Fragment Variable

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

جدول ۱. توالی‌های پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن‌های *EGFR*، *BCL-2*، *BAX* و *GAPDH*

نام ژن	نوع پرایمر	ترادف	طول قطعه تکثیری	دمای°C	درصد GC
EGFR	پیشرو	GTTTGCCAAGGCACGAGTAAC	۱۰۳	۵۴/۴	۵۲/۴
EGFR	معکوس	TCCCAAGGACCACCTCACAG		۵۵/۹	۶۰
BCL-2	پیشرو	ATGGCGCACGCTGGGAGAAC	۱۰۲	۵۷/۹	۶۵
BCL-2	معکوس	ATCTCCCGCATCCCACTCGTAG		۵۸/۶	۵۹/۱
BAX	پیشرو	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	۱۰۱	۵۶/۷	۵۴/۵
BAX	معکوس	TGTCCACGGCGGCAATCATC		۵۵/۹	۶۰
GAPDH	پیشرو	CACCACACTGAATCTCCCCT	۱۱۵	۵۹/۳۵	۵۵
GAPDH	معکوس	TGGTTGAGCACAGGGTACTT		۵۷/۳۰	۵۰

qRT-PCR

سطوح بیان این ژن‌ها *BAX*، *BCL-2*، و *EGFR* با qRT-PCR و با دستگاه ترمو سایکلر (RAD-BIO-RAD USA) و با استفاده از رنگ سایبرگرین (Thermo Fischer Scientific, master mix Waltham, MA, USA) اندازه‌گیری شد. ژن گلسیرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز[13] (*GAPDH*) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. مقدار Ct با استفاده از Ct ژن مرجع *GAPDH* و برای محاسبه میزان تغییرهای بیان ژن‌ها نرمال‌سازی شد. تمامی واکنش‌های PCR با سه تکرار انجام شد. طراحی پرایمر با نرم‌افزار oligo ۷ انجام شد. ویژگی‌های پرایمر ها در (جدول ۱) نشان داده شده‌اند.

آنالیز آماری

تفاوت سطح بیان ژن‌ها بین سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی با استفاده از paired *t*-test آنالیز شد، و همه آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار PRISM 9.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) انجام شد. میزان بیان ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد، سطح معنی داری ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی بیان ژن‌های *BCL-2*، *BAX* و *EGFR* بعد از تیمار با پروتئین‌ها

سطح بیان mRNA ژن‌های آپوپتوزی *BCL-2* و ضدآپوپتوزی *BAX* و ژن گیرنده سطحی *EGF* در سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی پس از تیمار با IT[14] (Pani[15]-RTA، RTA و Panitumumab (Pani) با استفاده از qRT-PCR آنالیز شدند. آنالیز داده‌های بیانی نشان داد که میزان تغییرهایی در بیان ژن *BAX* در سلول‌های سرطانی تیمار شده با IT (Pani-RTA) به‌طور معنی‌داری ($P=۰/۰۰۳$ برای MDA-MB-468 و $P=۰/۰۰۱$ برای HCT-116) بالاتر از سلول‌های کنترل بود، در حالی‌که بیان همین ژن تحت‌تاثیر RTA تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱A, B). بیان ژن‌های *BCL-2* (شکل ۱C, D) و *EGFR* (شکل ۱F) در سلول‌های سرطانی تحت تاثیر IT (Pani-RTA) و RTA کاهش معنی‌داری داشتند به جز سلول‌های HCT-116 تیمار شده با RTA که بیان ژن *EGFR* اختلاف معنی‌داری با سلول کنترل نشان نداد (شکل ۱E). بین سلول‌های سرطانی و کنترل در بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* و *EGFR* تیمارشده با Pani اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) دیده نشد (شکل A-F). در همه سلول‌ها بیش‌ترین افزایش بیان ژن *BAX* و کاهش بیان ژن

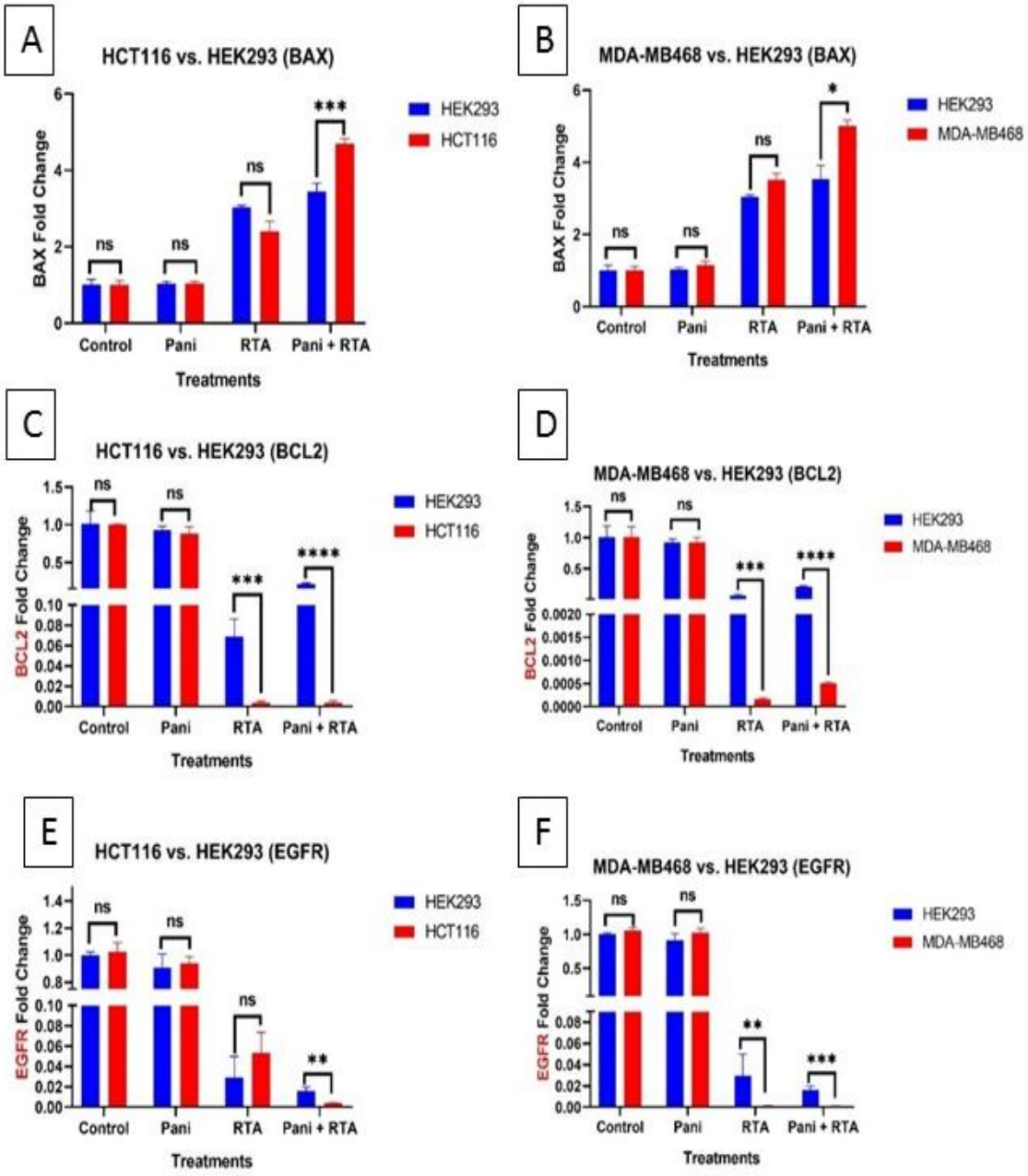
[13] glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

[14] Immunotoxin
[15] Panitumumab (scFv)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

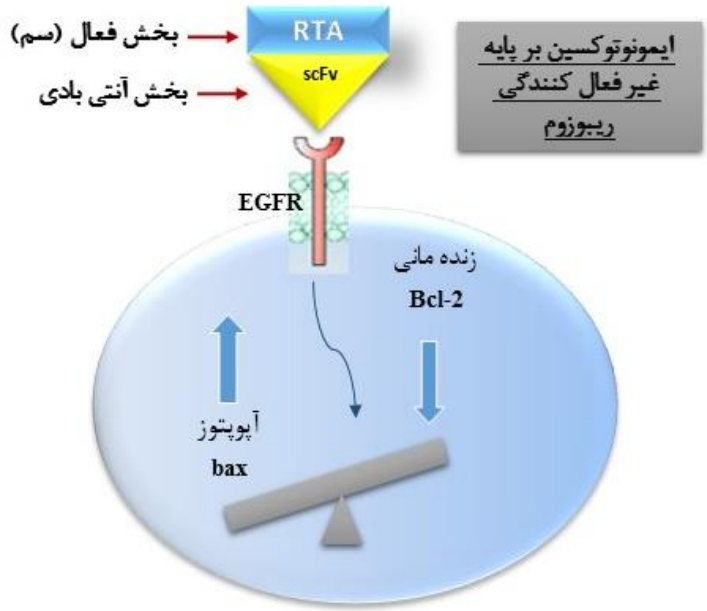
BCL-2 در تیمار با IT (Pani-RTA) را نشان داد که بیانگر کشندگی اختصاصی IT و هدایت سلول به سمت آپوپتوز بود (شکل ۲). از طرفی کم‌ترین افزایش بیان ژن *BAX* و کاهش بیان ژن *BCL-2* در تیمار با Pani نسبت‌به تیمار با RTA و Pani-RTA مشاهده شد (شکل ۱A-E). به‌طوری‌که تغییرهای بیان ژن‌های مورد مطالعه در تیمار با Pani معنی‌دار نبود.



شکل ۱. آنالیز Real-time PCR میزان تغییرها در بیان نسبی ژن‌های *BAX*، *BCL-2* و *EGFR* با استفاده از GAPDH به‌عنوان ژن مرجع. A: میزان تغییرهای ژن *BAX* در رده سلولی HCT-116 و HEK-293. B: میزان تغییرهای ژن *BAX* در رده سلولی MDA-MB-468 و HEK-293. C: میزان تغییرهای ژن *BCL-2* در رده سلولی HCT-116 و HEK-293. D: میزان تغییرهای ژن *BCL-2* در رده سلولی MDA-MB-468 و HEK-293. E: میزان تغییرهای ژن *EGFR* در رده سلولی HCT-116 و HEK-293. F: میزان تغییرهای ژن *EGFR* در رده سلولی MDA-MB-468 و HEK-293. (ns: غیرمعنی‌دار؛ *: P= 0.03؛ **: P= ۰/۰۰۲؛ ***: P= ۰/۰۰۱؛ ****: P= ۰/۰۰۰۱)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]



شکل ۲. ایمونوتوکسین حاوی بخش فعال (سم ریسین) متصل شده به بخش زنجیره متغیر تک نوکلئوتیدی آنتی‌بادی (پانیتومومب) بعد از اتصال به گیرنده عامل رشد اپیدرمی (EGFR) باعث القاء آپوپتوز از طریق اعضای خانواده *BCL-2* می‌شود.

بحث

نقص در توقف مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یک عامل مهم در بروز تومورزایی است. محققان بالینی روش‌های مختلفی را برای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در درمان سرطان به‌کارگرفته‌اند. در اغلب موارد تحریک و/یا بازگرداندن مرگ سلولی آپوپتوزی منجر به سرکوب یا تغییر تومورزایی می‌شود. مرگ سلولی غیرآپوپتوزی به‌عنوان یک مسیر جایگزین برای کشتن سلول-های توموری مقاوم به پرتودرمانی یا شیمی درمانی، مطرح شده است (۲۲). به‌تازگی، تمرکز مطالعه‌های بالینی بر روی مکانیسم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در نمو تومور و هم‌چنین برای بررسی مقاومت نسبت‌به شیمی درمانی سنتی و با امید به پیدا کردن داروهای هدفمند جدید یا بیومارکرهای پیش‌بینی کننده بوده است. عمده این مطالعه‌ها بیان تعدادکمی از ژن‌های مربوط به آپوپتوز را در سطح RNA یا پروتئین آزمایش کرده‌اند. در مطالعه‌های بر روی سرطان، نتایج بحث برانگیزی به‌دست آمده که دلیل آن پیچیدگی مسیر آپوپتوزی است (۲۴،۲۳). باید این موضوع مهم را در نظر گرفت که در طبیعت پیچیده آپوپتوز، تعادل بین کنش القاءکنندگی و ضدآپوپتوزی، بسیار وابسته‌به هم تنظیم می‌شوند، و ارتباط متقابل بین آن‌ها به‌طور کامل پیچیده و گاهی در تضاد است (۲۵). از طرفی می‌دانیم که در درمان سرطان با آنتی بادی‌های تک دودمانی، این مولکول‌ها می‌توانند اتصال لیگاند را مهار کرده، و انتقال پیام سلولی را مسدود و بیان ژن *EGFR* را کنترل کنند. اما بر خلاف آن‌ها ایمونوتوکسین‌ها به‌طور مستقیم و به‌طور اختصاصی سلول‌های توموری را به‌وسیله القاء آپوپتوز از بین می‌برند. به‌منظور درک عمیق‌تر از اثر ایمونوتوکسین بر روی سلول سرطانی، در این مطالعه تأثیر یک ایمونوتوکسین جدید بر روی بیان ژن‌های *BCL-2*، *BAX* و *EGFR* با روش PCR کمی مورد بررسی قرار گرفت. در همین راستا بررسی بیان ژن‌ها بعد از تیمار مشخص کرد که القا آپوپتوز سلولی به‌وسیله افزایش ژن *BAX* و کاهش ژن *BCL-2* رخ می‌دهد. لذا به‌نظر می‌رسد که تیمار با ایمونوتوکسین باعث افزایش کشندگی در هر دو رده سلول سرطانی کلورکتال و پستان در مقایسه با سلول نرمال شد. در سلول‌های MDA-MB-48 بیان زیاد ژن *BAX* (حدود ۶٪) و کاهش سطح بیان ژن *BCL-2* (حدود ۶۰۰٪) بیش‌تر از سلول-های HCT-116 بود (شکلA-B ۱). نتایج نشان دادند که سطح بیان *EGFR* در هر دو سلول سرطانی در مقایسه با سلول نرمال HEK293 به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کردند. کاهش بیان ژن *EGFR* تحت تأثیر ایمونوتوکسین در سلول‌های سرطان پستان بیش‌تر از سلول‌های سرطان کلورکتال بود که توجیه آن می‌تواند تعداد بیش‌تر گیرنده *EGF* بر روی سطح سلول‌های سرطان پستان ($۱/۵\times۱۰^{۶}$) نسبت‌به سلول‌های سرطان کلورکتال ($۱/۵\times۱۰^{۵}$-۱) باشد (۲۷،۲۶).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

تحقیقات نشان داده که کشندگی scFv به‌تنهایی نسبت‌به ایمونوتوکسین به طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر است، در همین راستا scFv مطالعه حاضر کشندگی کمی بر روی سلول‌ها نشان داد. این مولکول با ویژگی هدف‌گیری عالی به‌عنوان یک حامل برای بخش توکسینی بر علیه گیرنده سلول هدف در ایمونوتوکسین‌ها کاربرد دارد (۲۸). به طوری‌که در تحقیق بر روی ایمونوتوکسین 4KB-PE40، مقدار ۵۰ درصد غلظت مهاری (IC50)[16] برای ایمونوتوکسین، ۷ nM و برای scFv به تنهایی ۳۲۰۰ nM بود، که نمایان‌گر کشندگی بسیار کم‌تر scFv در مقایسه با ایمونوتوکسین بود(۲۸).

بر خلاف تحقیقاتی که در آن‌ها سطح بیان ژن *BAX* برای فعال شدن فرآیند مرگ سلولی افزایش یافته بود، در مطالعه حاضر بیان ژن *BAX* در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر RTA افزایش قابل توجهی نشان نداد، داده‌های ما مشابه یافته سایر محققین نشان داد که *BAX* به‌احتمال در طی فرآیند مرگ، دستخوش تخریب شده است. یافته این محققان نشان داد که تخریب *BAX* در نقش پرو-آپوپتوتیکی آن تداخلی ایجاد نمی‌کند که نمایانگر پیچیدگی مکانیسم آپوپتوز فعال شده توسط *BAX* است. دیده شده است بعضی پروتئین‌های پرو-آپوپتوتیک و آنتی-آپوپتوتیک توسط پروتئازهایی همانند کاسپازها در روند آپوپتوز در سیستم‌های گوناگون تخریب شده‌اند (۳۲-۲۹).

فرآورده پروتئینی *BCL-2* می‌تواند مولکول *BAX* را جدا کند و مانع از فعال شدن آبشار پائین دستی در میتوکندری شود (۳۳). بنابراین، نسبت غلظت دو مولکول *BCL-2/BAX* در مسیر آپوپتوز که به کاسپازها وابسته است بسیار مهم است. Cokergurkan و همکاران نشان دادند که استفاده طولانی مدت با دوز کم از ماده شیمیایی Purvalanol (یک ممانعت-کننده پروتئین کیناز) در درمان سلول‌های HCT-116 باعث شروع مرگ سلولی با مکانیسم آپوپتوز وابسته‌به کاسپازها شده است. این مسیر به‌وسیله تنظیم توسط اعضای خانواده *BCL-2* انجام گرفت (۳۴). هم‌چنین Huang و همکاران نشان دادند که Celecoxib (یک داروی ضدالتهاب و غیراستروئیدی است که باعث مهار فعالیت COX-2 می‌شود) باعث القاء آپوپتوز و اتوفاژی در سلول‌های سرطان کلورکتال انسانی می‌شود که هر دو فرآیند می‌توانند توسط *BCL-2/BCL-XL* به‌صورت منفی تنظیم شوند. هم‌زمان مولکول ABT-737 به‌عنوان یک دارو با عملکرد جلوگیری از فعالیت *BCL-2/BCL-XL* می‌تواند باعث القا آپوپتوز و اتوفاژی به‌واسطه Celecoxib شود و تجویز این داروها با یکدیگر و اثر هم‌افزایی در کشندگی دارند (۳۵). یافته‌های فوق در تأیید مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر *BCL-2* در آپوپتوز بعد از تأثیر عامل ضد سرطان است.

به‌طور خلاصه خانواده *BCL-2* در تنظیم آپوپتوز در سرطان کلورکتال و پستان دخیل هستند و یافته این مطالعه نشان داد که امکان درمان هدفمند سرطان به‌واسطه استفاده از یک آنتی-بادی تک دودمانی بر علیه *EGFR* در سلول‌هایی که بیان بالای *EGFR* را دارند و اتصال آن به سم کشنده ریسین باعث القاء مرگ سلولی می‌شوند (شکل ۲). علاوه‌بر آن مشخص شده است که این فرآیند می‌تواند توسط دو ژن کلیدی *BCL-2* و *BAX* تنظیم شود. در کنار آن می‌توان به این نکته اشاره کرد که چون سلول‌های هدف توسط القاء آپوپتوز کشته می‌شوند، احتمال بروز صدمات عمومی (سیستمیک) کم‌تر رخ خواهد داد چون سلول‌های آپوپتوزی متراکم و جمع می‌شوند، در حالی‌که اندامک‌ها و غشاء پلاسمایی یکپارچگی خود را حفظ می‌کنند. در پی بروز آپوپتوز سلول‌های مرده به سرعت توسط ماکروفاژها بلعیده و قبل از اینکه محتویات آن به بیرون نشت کرده و باعث پاسخ‌های سیستمیک شود، حذف می‌شوند. به نظر می‌رسد تأثیر ایمونوتوکسین فوق بر روی تنظیمات صحیح آپوپتوز نقش مهمی در جلوگیری از تکثیر و پیشرفت سرطان‌ها دارد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که پیشرفت کلینیکی درمان بر پایه آنتی‌بادی‌ها رو به افزایش است، درک بیش‌تر ما از ایمونوتوکسین‌های جدید و هدف‌گیری شده با توانایی القاء آپوپتوز می‌تواند راه‌های جدیدی را در درمان بیماری‌ها و به‌ویژه تومورها باز کند.

[16] Inhibitory Concentration

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

منابع

1. Ferlizza, E., et al., *The roadmap of colorectal cancer screening.* Cancers, 2021. **13**(5): p. 1101.

2. Siegel Rebecca, L. and D. Miller Kimberly, *Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2019.* CA: a cancer journal for clinicians, 2019. **69**(1): p. 7-34.

3. Eisenberg-Lerner, A., et al., *Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them.* Cell Death & Differentiation, 2009. **16**(7): p. 966-975.

4. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members.* Biochemical and biophysical research communications, 2003. **304**(3): p. 437-444.

5. Banjara, S., et al., *The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms.* Biomolecules, 2020. **10**(1): p. 128.

6. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases.* Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-8567.

7. Bursch, W., et al., *Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments.* Journal of cell science, 2000. **113**(7): p. 1189-1198.

8. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-219.

9. Simon, N. and D. FitzGerald, *Immunotoxin therapies for the treatment of epidermal growth factor receptor-dependent cancers.* Toxins, 2016. **8**(5) :p. 137.

10. Jurišić, V., et al., *Epidermal growth factor receptor gene in non-small-cell lung cancer: the importance of promoter polymorphism investigation.* Analytical Cellular Pathology, 2018. **2018**.

11. Malapelle, U., et al., *Epidermal growth factor receptor exon 20 insertion variants in non-small cell lung cancer patients.* Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2022. **169**: p. 103536.

12. Kaufman, N.E., et al., *Molecular targeting of epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR).* Molecules, 2021. **26**(4): p. 1076.

13. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer.* Journal of clinical oncology, 2003. **21**(14): p. 2787-2799.

14. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.* Critical reviews in oncology/hematology, 1995. **19**(3): p. 183-232.

15. Dosio, F., P. Brusa, and L. Cattel, *Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components.* Toxins, 2011. **3**(7): p. 848-883.

16. Yamaizumi, M., et al., *One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell.* Cell, 1978. **15**(1): p. 245-250.

17. Booth, B.J., et al. *Extending human IgG half-life using structure-guided design*. in *MAbs*. 2018. Taylor & Francis.

18. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains.* Nature biotechnology, 2005. **23**(9): p. 1126-1136.

19. Schlessinger, J., et al., *Monoclonal antibodies specific to human epidermal growth factor receptor and therapeutic methods employing same*. 2001, Google Patents.

20. Polito, L., et al., *Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin.* Toxins, 2019. **11**(6): p. 324.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]

21. Jiao, P., et al., *Construction and characterization of the recombinant immunotoxin RTA-4D5-KDEL targeting HER2/neu-positive cancer cells and locating the endoplasmic reticulum.* Applied microbiology and biotechnology, 2018. **102**(22): p. 9585-9594.

22. Scarlatti, F., et al., *Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(18): p. 18384-18391.

23. Mishra, A.P., et al., *Programmed cell death, from a cancer perspective: an overview.* Molecular diagnosis & therapy, 2018. **22**(3): p. 281-295.

24. Neophytou, C.M., et al., *Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance.* Cancers, 2021. **13**(17): p. 4363.

25. Opferman, J.T. and A. Kothari, *Anti-apoptotic BCL-2 family members in development.* Cell Death & Differentiation, 2018. **25**(1): p. 37-45.

26. Filmus, J., et al., *Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants.* Molecular and cellular biology, 1987. **7**(1): p. 251-257.

27. Häggblad Sahlberg, S., et al., *The effect of a dimeric Affibody molecule (ZEGFR: 1907) 2 targeting EGFR in combination with radiation in colon cancer cell lines.* International journal of oncology, 2012. **40**(1): p. 176-184.

28. Della Cristina, P., et al., *Systematic comparison of single-chain Fv antibody-fusion toxin constructs containing Pseudomonas Exotoxin A or saporin produced in different microbial expression systems.* Microbial cell factories, 2015. **14**(1): p. 1-17.

29. Chen, G., et al., *Apoptosis in Gastric Epithelial Cells Is Induced byHelicobacter pyloriand Accompanied by Increased Expression of BAK.* Biochemical and biophysical research communications, 1997. **239**(2): p. 626-632.

30. Wood, D.E., et al., *Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis.* Oncogene, 1998. **17**(9): p. 1069-1078.

31. Li, B. and Q.P. Dou, *Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(8): p. 3850-3855.

32. Breitschopf, K., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid: a functional consequence on apoptosis induction.* Journal of Biological Chemistry:(28)275.2000 ,p. 21648-21652.

33. Lin, C.-H., et al., *Editor's highlight: periodic exposure to smartphone-mimic low-luminance blue light induces retina damage through Bcl-2/BAX-dependent apoptosis.* Toxicological Sciences, 2017. **157**(1): p. 196-210.

34. Çoker Gürkan, A., et al., *Purvalanol induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis and autophagy by purvalanol in HCT 116 colon cancer cells.* 2015.

35. Huang, S. and F. Sinicrope, *Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells.* Autophagy, 2010. **6**(2): p. 256-269.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.50.7.7]