

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

Pooyan Honari¹, Delavar Shahbazzadeh², Mahdi Behdani², 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: IC₅₀ 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*.

ارزیابی اثرهای ضدسرطانی پتید ملتین بر

رده سلولی سرطان ریه در شرایط برون تنی

پویان هنری^۱، دلاور شهباززاده^۲، مهدی بهدانی^۲، کامران پوشنگ باقری^{۲*}

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های 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 سرطانی 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 پتید ملتین پرداخته‌اند. هدف ما از این مطالعه بررسی اثرهای ضدسرطانی ملتین بر سلول‌های Calu-3 سرطان ریه می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** میزان کشندگی توسط ملتین بر روی دو رده سلولی Calu-3 و MRC5 (به‌عنوان سلول نرمال) با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش Real-Time PCR برای مشخص شدن بیان ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز شامل BAX، BCL2 و CASP3 استفاده گردید. در نهایت به‌منظور بررسی نقش مهارت ملتین بر فرآیند مهاجرت سلولی، از روش آزمون ارزیابی مهاجرت سلولی استفاده شده‌است.

یافته‌ها: میزان ۵۰٪ کشندگی (IC₅₀) برای ملتین برای دو رده سلولی Calu-3 و MRC5 به‌ترتیب ۱/۶۷ μg/mL و ۳/۴۴ μg/mL در ۲۴ ساعت به‌دست آمد. میزان بیان ژن‌های 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 بیان ژن BCL2 در سلول‌های Calu-3 ۰/۳۵ برابر و در سلول‌های MRC5 ۰/۶۴ برابر نسبت به گروه تیمار نشده کاهش یافت. به‌علاوه نتایج حاصل از آزمون ارزیابی مهاجرت سلولی نشان‌دهنده مهار فرآیند مهاجرت سلولی توسط ملتین بود.

نتیجه‌گیری: ملتین اثرات ضدسرطانی بر روی رده سلولی Calu-3 سرطان ریه نشان می‌دهد. به‌علاوه ملتین می‌تواند موجب القای آپوپتوز و مهار مهاجرت سلولی در سلول‌های سرطانی ریه گردد. ملتین با افزایش بیان ژن‌های مؤثر در فرآیند آپوپتوز باعث حرکت سلول‌ها به سمت مرگ سلولی می‌گردد. علاوه بر این با توجه به مقایسه نتایج به‌دست آمده از اثرهای ملتین بر رده سلول سرطانی Calu-3 با رده سلول سالم MRC5 می‌توان نتیجه گرفت که اثرگذاری این پتید بر سلول‌های سرطانی به‌میزان بالاتر و در دوزهای پایین‌تری صورت می‌گیرد.

واژگان کلیدی: NSCLC، ملتین، آپوپتوز، BAX، CASP3، BCL2.

مقدمه

سرطان ریه یکی از پیش‌تازان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان جهان می‌باشد (۱، ۲). دو نوع سرطان ریه 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). با این حال 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

سرطان ریه) می‌گردد (۵، ۲۴). BCL2 نیز یک پروتئین ضدآپوپتوزی بوده که توسط ژن‌هایی به‌همین نام بیان می‌شود (۲۵). این پروتئین به علت نقش ویژه 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 برنامه‌ریزی‌شده 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 سمی، رادیودرمانی و ایمنی‌درمانی افزایش بیان پیدا می‌کند (۲۷). از آنجایی که 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). توجه به مطالب بیان‌شده هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدسرطانی ملیتین بر رده سلولی Calu-3 از سرطان NSCLC و مقایسه 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 توسط 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.

این نوع از سرطان در مراحل اولیه، امکان بهبود پیش‌آگهی^۱ 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 سمیت 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 حفره غشایی و وزیکول‌های غشایی می‌گردد (۱۳، ۱۴). تاکنون ملیتین خاصیت ضدسرطانی، ضدباکتریایی، ضد میکروبی و حتی ضدالتهابی در سلول و مدل‌های حیوانی از خود نشان داده‌است (۱۵، ۱۶). این پپتید می‌تواند باعث القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، مهار رشد و مهاجرت سلولی در چندین سرطان مختلف گردد (۱۷-۱۹). به‌علاوه ملیتین دارای بار مثبت بوده و تمایل بالایی به غشاهای دارای بار منفی دارد. در نتیجه از آنجایی که 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 هتروداایمر با یک پروتئین ضدآپوپتوزی دیگری در سیتوپلاسم دیده می‌شود (۵). در شرایط نرمال، میزان بیان ژن تولیدکننده 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

¹ Prognosis

میکروپلیت-ریدر (Biotek, Germany) مورد خوانش قرار گرفت. با توجه به میزان خوانش نور توسط دستگاه، درصد سلول‌های زنده‌مانده (Cell Viability) مورد محاسبه قرار گرفت. همچنین تمامی آزمایش‌ها به شکل سه‌گانه و سه بار تکرار نیز انجام شدند.

Real-Time PCR

به این منظور ابتدا 3×10^4 سلول درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه بارگذاری و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس غلظت IC_{50} از ملیتین به هر کدام از چاهک‌ها به جز گروه کنترل اضافه شد و دوباره سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند. به منظور استخراج کل RNA از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در مرحله بعدی cDNA هر سلول بر اساس RNA استخراج‌شده در مرحله قبل و با استفاده از کیت سنتز Cdna (یکتا تجهیز آزما، ایران) سنتز گردید. به منظور بررسی بیان ژن‌های *BCL2*، *BAX*، *CASP3* و *GAPDH* (به عنوان ژن کنترل)، پرایمرهایی طبق جدول ۱ طراحی شدند. فرآیند Real-Time PCR در ۴۰ سیکل و برای هر سیکل به ترتیب جدول ۲ انجام پذیرفت. میزان تغییر بیان ژن‌ها با محاسبه میزان Fold Change مورد محاسبه قرار گرفت و میزان بیان تمامی ژن‌ها نسبت به ژن‌های گروه کنترل به عنوان رفرنس مورد بررسی قرار گرفتند.

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 محیط کشت DMEM (گیبکو، آمریکا) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و $100 \mu\text{g/mL}$ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penstrep-400) اضافه شده و در دمای 37°C انکوبه شدند.

آزمون MTT

میزان سمیت ملیتین برای سلول‌های نرمال و سرطانی با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا 3×10^4 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 $\mu\text{g/mL}$ از ملیتین تیمار شده و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس $20 \mu\text{L}$ از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای 37°C به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شده و $200 \mu\text{L}$ از محلول DMSO ۱ درصد به هر چاهک اضافه شد. در نهایت میزان جذب نور در 540 nm توسط هر چاهک به کمک دستگاه

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

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

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

مرحله	درجه حرارت / مدت زمان
Initial Denaturation	94°C ۵ دقیقه
Denaturation	94°C ۳۰ ثانیه
Annealing	61°C ۵ دقیقه
Extension	72°C ۱ دقیقه
Final Elongation	72°C ۵ دقیقه

آنالیز آماری

کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) 9 انجام گرفت. به‌علاوه تمامی آزمایش‌ها به شکل سه‌بار تکرار انجام شده‌اند. تفاوت بین گروه تیمار شده و گروه کنترل از طریق one-way ANOVA با $p\text{-Value} \leq 0.05$ محاسبه شده‌است.

نتایج

نتایج آزمون MTT

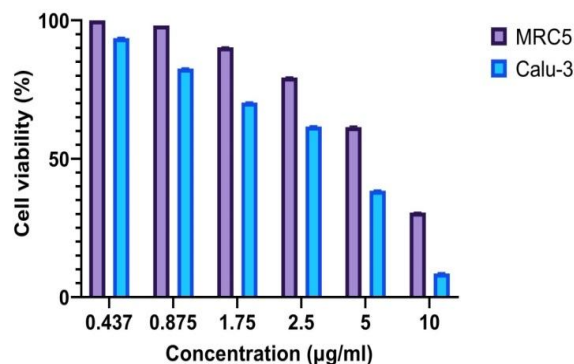
نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون نشان می‌دهد که ملیتین باعث مهار تکثیر سلولی و کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های Calu-3 می‌شود (نمودار ۱). همچنین دارای اثر مشابه بر سلول‌های نرمال MRC5 در دوزهای بالاتر می‌باشد. مقدار IC_{50} برای سلول‌های Calu-3 و MRC5 در بازه‌های زمانی متفاوت در جدول ۳ و نمودار ۲ نمایش داده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

آزمون خراش زخم

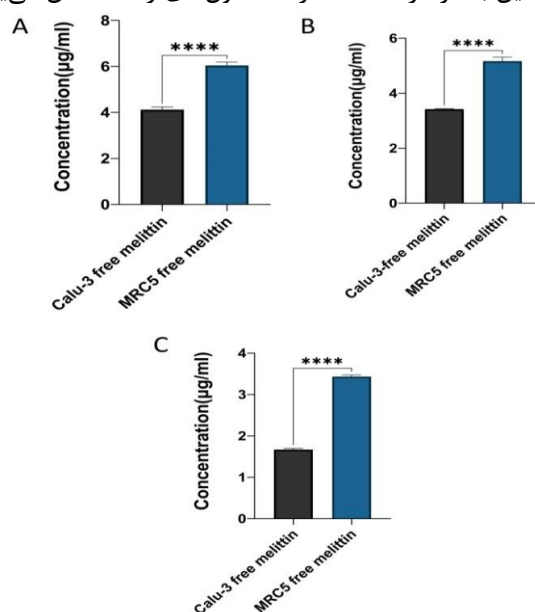
به این منظور ابتدا 3×10^4 سلول درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۲۴ خانه بارگذاری و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. در ادامه غلظت IC_{50} از ملیتین به هر کدام از چاهک‌ها به جز گروه کنترل اضافه شد و دوباره سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردیدند. در این مرحله با کمک سر یک پیپت p200 به آرامی 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 میکروسکوپ معکوس قرار گرفت. در نهایت عکس‌های گرفته‌شده با استفاده از نرم‌افزار imageJ به شکل داده‌های نیمه‌کمی درآمدند.

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

زمان (ساعت)	IC_{50} برای رده سلولی Calu-3 ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} برای رده سلولی MRC5 ($\mu\text{g/mL}$)
۲۴	۳/۹	۵/۶۲
۴۸	۳/۴۲	۴/۵۷
۷۲	۱/۶۷	۲/۵۶



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 به کار گرفته شده، درصد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد.



نمودار ۲- مقایسه مقدار IC_{50} برای دو رده سلولی در بازه‌های مختلف زمانی

تفاوت معنادار مقدار IC_{50} برای MRC5 و Calu-3 به ترتیب 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

جدول ۴ به تفکیک برای هر ژن و هر سلول نشان داده شده است. با توجه به میزان p-value محاسبه شده که کمتر از ۰/۰۰۰۱ می‌باشد، نشان داده شده است که میزان تغییر بیان ژن‌های هدف در سلول‌های سرطانی Calu-3 نسبت به میزان تغییرات همین ژن‌ها در سلول‌های نرمال MRC5 دارای رابطه معناداری می‌باشند.

نتایج حاصل از Real-Time PCR به منظور مقایسه تغییرات بیان ژن‌ها

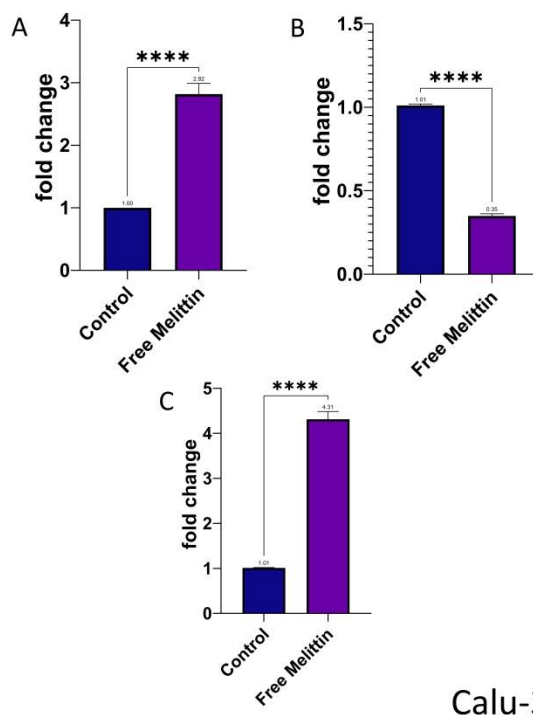
با توجه به مقدار Ct به دست آمده برای هر ژن، میزان Fold Change برای ژن‌های *BAX*، *BCL2* و *CASP3* برای رده‌های سلولی مورد بررسی محاسبه گردید. مقدار این فاکتور در

جدول ۴- مقایسه مقدار تغییرات بیان ژن‌های هدف (Fold Change) در دو رده سلولی MRC5 و Calu-3.

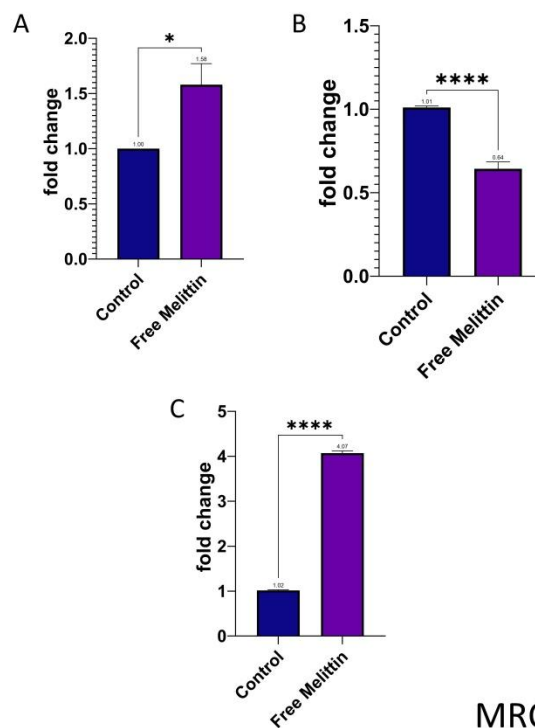
ردۀ سلولی	BAX	BCL2	CASP3
Calu-3	۲/۸۲	۰/۳۵	۴/۳۴
MRC5	۳/۵۸	۰/۶۴	۴/۰۷

***p-Value ≤ 0.0001

افزایش میزان ژن‌های القاکننده آپوپتوز در هر دو رده سلولی مشخص می‌باشد. نمودار ۳ نشان‌دهنده کاهش بیان ژن *BCL2* و افزایش بیان ژن‌های *CASP3* و *BAX* در سلول‌های تیمار شده با ملیتین می‌باشد.



نمودار ۳- مقایسه بیان ژن‌های *BAX* (A)، *BCL2* (B) و *CASP3* (C) در رده سلولی Calu-3



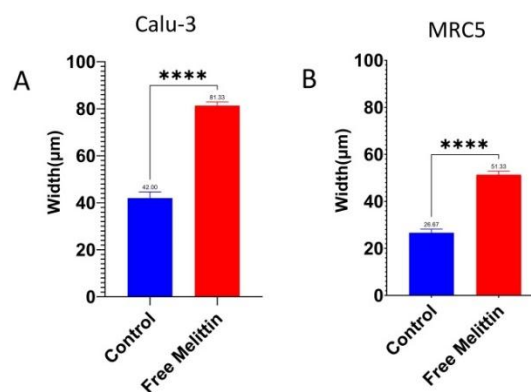
MRC5

نمودار ۴- مقایسه بیان ژن‌های (A) *BAX*، (B) *BCL2* و (C) *CASP3* در رده سلولی MRC5

نتایج آزمون خراش زخم

ملیتین نسبت به سلول‌های گروه کنترل کاهش پیدا کرد (نمودار ۵). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که سلول‌هایی که با ملیتین تیمار شده بودند، نیاز به زمان بیشتری برای پر کردن جای خراش و ترمیم زخم نسبت به سلول‌های تیمار نشده داشتند.

از این آزمون به‌منظور بررسی اثر مهار ملیتین آزاد بر مهاجرت و تهاجم سلول‌های هدف، استفاده شد. میزان قدرت مهاجرت سلولی در سلول‌های Calu-3 و MRC5 تیمار شده با



نمودار ۵- مهار مهاجرت سلولی توسط ملیتین

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

بحث

با توجه به میزان باقی‌مانده از پهنای زخم که در گروه MRC5 کمتر از سلول‌های Calu-3 می‌باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که اثر مهارى ملیتین بر رده سلولى سرطانی از سلول‌های نرمال بیشتر می‌باشد.

با توجه به میزان موفقیت کم و اثرهای جانبی زیاد درمان‌های رایج برای بیماران مبتلا به NSCLC، نیاز به یک استراتژی درمانی 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). همان‌طور که اشاره شد ملیتین به غشاهای دارای بار منفی متصل‌شده و این فرآیند با اتفاقاتی نظیر ایجاد ساختار حفره غشایی، نشت مواد حیاتی به بیرون از سلول‌ها و افزایش نفوذپذیری سلول‌ها همراه می‌شود که تمام این موارد در نهایت منجر به برهم خوردن تعادل غشا و لیز سلولی می‌گردد (۱۶، ۲۹). از آنجایی که 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 $0.437 \mu\text{g/mL}$ 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 منفی بیشتر غشای سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال بستگی داشته که باعث جذب و حمله 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 مقایسه نتایج حاصل‌شده از این مطالعه و موارد به‌دست‌آمده از مطالعه Yu و همکاران (۳۱) و همچنین مطالعه دیگری توسط Zhang (۳۲) و باوجود اینکه نوع رده سلولی به‌کار رفته در این دو مطالعه از

نوع A549 می‌باشد باز هم نزدیکی قابل‌توجهی بین نتایج 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 سمی ملیتین بر سلول‌های نرمال پایین‌تر از سلول‌های سرطانی می‌باشند. به عبارت دیگر با توجه به مقدار IC_{50} محاسبه‌شده که برای سلول‌های Calu-3 و MRC5 به ترتیب مقدار $3/9$ و $5/62$ 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 غیرسمی 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 مورد مطالعه نیاز می‌باشد به‌طوری‌که میزان IC_{50} برای سلول‌های Calu-3 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب میزان $3/9$ ، $3/42$ ، $1/67$ و برای سلول‌های MRC5 به ترتیب $5/63$ ، $4/57$ ، $2/56$ محاسبه شده‌است که در هر دو مورد روند کاهشی از خود نشان می‌دهد. از مقایسه این اعداد به‌دست‌آمده با مطالعه Yu (۳۱) و همچنین مطالعه Zhang (۳۲) می‌توان مشاهده نمود که میزان اثرپذیری سلول‌های سرطانی Calu-3 در مقایسه با سلول‌های سرطانی A549 نسبت به ملیتین مورد استفاده، بیشتر می‌باشد یعنی به‌عنوان مثال سلول‌های A549 به‌کار رفته در مطالعه ژانگ در غلظت‌های بالاتری از ملیتین مورد استفاده (بیش از $2 \mu\text{g/mL}$) شروع به کاهش درصد سلول‌های زنده‌مانده کرده و در نتیجه دارای میزان IC_{50} بالاتری نسبت به سلول‌های Calu-3 مورد استفاده در مطالعه 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 فشردن هسته سلول‌ها می‌شوند (۲۷). همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ملیتین آزاد می‌تواند باعث افزایش میزان کاسپاز-۳ در سلول‌های سرطان‌هایی چون پستان و

آن‌ها میزان ترمیم زخم بعد از ۷۲ ساعت ۴۰ درصد گزارش شده بود، می‌توان مشاهده نمود که با وجود تفاوت در رده سلولی انتخاب شده نتایج به دست آمده دارای نزدیکی قابل توجهی هستند، هرچند باز هم میزان اثرپذیری رده سلولی Calu-3 مورد مطالعه در این مقاله در مقایسه با رده سلولی A549 نسبت به ملیتین بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

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

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافی ندارند.

پروستات گردند (۱۴). میزان بیان ژن‌های 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 بیان ژن ضدآپوپتوزی BCL2 به‌میزان ۰/۳۵ و ۰/۶۴ برابر، کاهش پیدا کرده بود. این موارد حاکی از القای آپوپتوز توسط ملیتین در سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد. به‌علاوه میزان افزایش و کاهش این ژن‌ها در سلول‌های سرطانی Calu-3 از سلول‌های نرمال MRC5 بیشتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر سلول‌های نرمال نسبت به ملیتین می‌باشد. از طرف دیگر با بررسی نتایج حاصل از مطالعه Zhang (۳۲) بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه که میزان تغییرات بیان ژن‌ها BAX و BCL2 را به‌ترتیب ۱/۳ و ۰/۳ گزارش کرده بودند، با اعداد به دست آمده در این مطالعه می‌توان به حساسیت بیشتر رده سلولی Calu-3 به علت فرم ساختار کروی و توده‌ای و دیواره سلولی متفاوت نسبت به ملیتین در مقایسه با رده سلولی A549 اشاره نمود. به‌علاوه در مطالعه Yu (۳۱) بر روی اثرهای ضدسرطانی ملیتین بر روی رده سلولی A549 میزان تغییرات بیان ژن CASP3 مقدار ۲/۸۷ گزارش شده است که نسبت به مطالعه حاضر بر روی رده سلولی Calu-3 مقدار کمتری را نشان می‌دهد که باز هم می‌تواند گواه بر اثرپذیری بیشتر این رده سلولی نسبت به رده 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 سلولی فعال سلول‌های سرطانی می‌باشد (۳۰، ۳۱). در این مطالعه نشان داده شد که ملیتین می‌تواند باعث مهار فرآیند مهاجرت سلولی در هر دو رده 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. علاوه بر موارد گفته شده، از مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با پژوهش Yu (۳۲) و Zhang (۳۳) بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه که در

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, Vredenburg 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, Elsbali 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.

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.