مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضدسرطانی توکسین آزورین نوترکیب بر روی رده سلولی سرطان پستان

حسن رحیمی ساعتلو[۱]، بهرام گلستانی ایمانی[۲]

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۷/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان پستان فراوان‌ترین نوع بدخیمی در میان زنان است. امروزه از روش‌های مختلف شیمی‌درمانی، جراحی و اشعه درمانی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود. بااین‌حال، یکی از معایب و عوارض جانبی این روش‌ها از بین بردن سلول‌های سالم است. این امر سبب شده که محققان به سمت روش‌های جدید درمان با کاهش عوارض جانبی روی بیاورند. آزورین یک متالوپروتئین مستقیم ردوکس باکتریایی با اثر سیتوتوکسیک است که توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود. توکسین آزورین نوترکیب می‌تواند با کاهش عوارض جانبی و آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی برای درمان سرطان پستان مورداستفاده قرار گیرد. هدف این مطالعه بررسی اثر ضد سرطانی توکسین آزورین نوترکیب روی رده سلولی سرطان پستان بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی بعد از کلونینگ و بیان آزورین نوترکیب در باکتری E.coli، اثر سیتوتوکسیتی غلظت‌های مختلف آن روی سلول‌های سرطان پستان MCF7 و سلول‌های طبیعی HEK293 به روش MTT assay ارزیابی شد.

یافته‌ها: آزورین در تمامی غلظت‌ها و حتی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی رده سلولی MCF7 اثر سیتوتوکسیتی بیشتری نسبت به رده سلولی HEK293 داشت. افزایش سیتوتوکسیستی و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت پروتئین آزورین همراه بود، بنابراین درصد سیتوتوکسیسیتی این پروتئین روی رده سلولی MCF7 با غلظت پروتئین نوترکیب ارتباط مستقیم و درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با غلظت پروتئین نوترکیب ارتباط معکوس داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آزورین می‌تواند تا حدودی علیه سلول سرطانی پستان گزینشی عمل کند. این یافته‌ها امیدوارکننده برای استفاده از آزورین به عنوان یک عامل درمانی جدید و کم‌هزینه برای درمان سرطان پستان هستند.

کلیدواژه‌ها: سرطان پستان، کلونینگ، اشرشیا کلی، سودوموناس، آزورین نوترکیب

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره یازدهم، ص ۶۸۳-۶۷۵، بهمن ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تلفن:۰۹۱۲۸۰۹۵۳۷۷

Email: golestani_bahram@yahoo.com

مقدمه

آزورین یک پروتئین با وزن مولکولی کم، آبی، حاوی مس است که به‌طور طبیعی در سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود (۱). طول ژن کد کننده‌ی آزورین ۱۲۸۷bp جفت باز است که یک پروتئین ۱۴ کیلو دالتون حاوی ۱۲۸ اسیدآمینه را کد می‌کند (۲). آزورین در دهه‌ی گذشته به دلیل سمیت سلولی نسبت به انواع سلول‌های سرطانی توجه زیادی به خود جلب کرده است (۳، ۴). آزورین دارای خاصیت سایتوتوکسیک است و می‌تواند به‌طور خاص به سلول‌های سرطانی انسان نفوذ کند، به‌ویژه سرطان پستان و باعث آپوپتوز شود و در سلول‌های طبیعی فعالیت آشکاری نداشته باشد (۵، ۶). آزورین یک پروتئین همه‌کاره است و در چندین مسیر سیگنال‌دهی مستقل مرتبط با پیشرفت سرطان دخالت می‌کند. تاکنون، چندین مکانیسم مختلف برای فعالیت ضد سرطانی آزورین ارائه شده است (۷). سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان بوده به‌طوری‌که طبق گزارش GLOBOCAN، تقریباً 1.38 میلیون سرطان جدید پستان در سال ۲۰۰۸ و ۱.۶۷ میلیون مورد در ۲۰۱۲ تشخیص داده شده است (۸). سالانه بیش از ۸۵۰۰ مورد جدید از این بیماری در کشور ایران تشخیص داده می‌شود که بقای عمر ۵ ساله‌ی بیماران حدود ۶۰ الی ۸۰ درصد گزارش شده است (۹). درمان‌های کنونی سرطان و البته در مورد سرطان پستان، متکی به جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی یا حتی هورمون درمانی است. بااین‌حال، این درمان‌ها می‌توانند عوارض جانبی جدی و سیستمیک را در سلامت بیمار به

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

[۲*] استادیار ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

دلیل سمیت بالا و عدم اختصاصیت بافت سرطانی ایجاد کنند (۱۰). سرطان پستان شامل گروهی از بیماری‌های ناهمگن بیولوژیکی و مولکولی منشأ گرفته از پستان است، درحالی‌که عوامل مؤثر در بروز این سرطان با توجه به سایر سرطان‌ها متفاوت است، تمایل و استعداد ژنتیکی که مهم‌ترین آن‌ها جهش در ژن BRCA1 و BRCA2 است، یکی از عوامل مهم برای بروز این بدخیمی است (۱۱).

به نظر می‌رسد که سرطان پستان ممکن است از سلول‌های بنیادی پستانداران ناشی شود. رشد طبیعی پستان و سلول‌های بنیادی توسط چندین مسیر سیگنال‌دهی نظیر گیرنده‌های ERs (Estrogen) و HER2 و Wnt/b-catenin تنظیم می‌شود که تکثیر سلول‌های بنیادی، مرگ سلولی، تمایز سلولی و تحرک سلولی را کنترل می‌کند. علاوه بر این، تنظیم‌اپی ژنتیکی و RNAهای غیرکدکننده نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارند (۱۱). آزورین با ۴ مکانیسم اثر ضد سرطانی خود را روی مولکول‌های هدف ایجاد می‌کند:

۱) p53: آزورین در رشد سلول توسط مکانیسم‌های مختلف ازجمله تشکیل کمپلکس با دامنه اتصال به DNA (DBD) پروتئین سرکوبگر تومور p53 دخالت می‌کند، آن را تثبیت می‌کند و سطح داخل سلولی آن را تقویت می‌کند که پس‌ازآن باعث القاء آپوپتوز می‌شود.

۲) تیروزین کینازهای غیر رسپتوری (FAK و Src): تهاجم‌های سرطانی را کاهش می‌دهند. بخصوص، هایپرفسفوریلاسیون تیروزین کیناز غیر رسپتوری مرتبط با بیان بیش‌ازحد P-کادهرین را کاهش می‌دهند.

۳) گیرنده‌های تیروزین کیناز EphB2: آزورین فسفوریلاسیون به‌واسطه‌ی ephrinB2 در تیروزین ephB2 را مهار می‌کند. درنتیجه در سیگنال‌دهی سلول بالادست دخالت کرده و به مهار رشد سلول‌های سرطانی کمک می‌کند.

۴) رسپتورهای کموکین و رسپتور تیروزین کیناز (EGFR): بیان گیرنده‌های غشایی درگیر در سیگنال‌دهی سلول را محدود می‌کنند. همچنین آزورین اثرات ضد سرطانی خودش را به‌واسطه‌ی مسیر ورود به سلول سرطانی، با مختل سازی گیرنده‌ی حفره غشایی و حذف گیرنده‌های انتخابی غشای سلولی که ممکن است بیش‌فعال شود اعمال می‌کند. بنابراین از فعال شدن دائمی و درنتیجه تومور جلوگیری می‌شود (۱۵-۱۲).

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد سرطانی آزورین در رده سلولی سرطان پستان MCF7 و رده سلولی طبیعی HEK293 بود.

مواد و روش کار

کلونینگ ژن آزورین در باکتری اشرشیا کلی TOP10:

سازه ژنی بهینه‌شده متصل به حامل پلاسمیدی pET28a به‌صورت آماده تهیه گردید و برای کلونینگ و بیان به ترتیب از باکتری‌های E.coli TOP10 و E.coliBL21(DE3) به‌عنوان میزبان استفاده شد. برای این منظور از پرایمرهای (T7TerminAtor 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3') و (T7promoTer 5'TAATACGACTCACTATAGGG3') برای تأیید ژن آزورین استفاده گردید. اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میلی مولار dNTPs، ۱ میلی مولار MgCL2، ۰/۵ میلی مولار از هرکدام از پرایمرها، ۰/۰۱ میکروگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز و ۱۸/۵ میکرولیتر آب استریل دیونیزه بود. واکنش با برنامه دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دوره شامل ۹۴ درجه سلسیوس (۲۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سلسیوس (۲۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سلسیوس (۲۰ ثانیه) و درنهایت یک مرحله ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مستعد سازی TOP10 برای ساب کلونینگ و BL21 برای بیان با استفاده از بافر کلرید کلسیم انجام گردید. پس از ترانسفورماسیون توسط شوک گرما-سرما باکتری‌ها در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد و کلنی‌ها به‌منظور انجام Colony PCR انتخاب گردید. PCR با شرایط دمایی و مخلوط واکنش اشاره‌شده در بالا انجام شد و محصول Colony PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

ساب کلونینگ و بیان ژن آزورین در باکتری اشرشیا کلی BL21:

از کلنی‌های حاوی حامل نوترکیب، پلاسمیدها به روش لیز قلیایی استخراج شد و وارد E.coli BL21 مستعد شده گردید. برای القای بیان از ایزوپروپیل بتادی تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) ۱ میلی مولار استفاده شد. پس از القای بیان در زمان‌های ۲، ۴ و ۲۴ ساعت نمونه‌برداری گردید و نمونه‌ها با افزوده شدن سمپل بافر و جوشانیدن به مدت ۵ دقیقه روی ژل SDS PAGE ۱۲درصد الکتروفورز شد (۱۶).

بیان پروتئین نوترکیب آزورین در مقیاس بالا:

ابتدا به درون فالکون حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB و ۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین کلنی تأییدشده در SDS PAGE اضافه گردید و بعد از ۲۴ ساعت به درون ارلن حاوی ۵۰

سی‌سی محیط کشت LB و ۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح شد و با رسیدن OD به ۰/۶-۰/۸ با IPTG ۱ میلی مولار القا گردید و پس از ۴ ساعت محتویات ارلن به داخل فالکون ریخته شد و بعد از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با 3500 rpm محلول رویی حذف گردید و رسوب باکتری‌ها جهت استخراج پروتئین در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب رسوب باکتریایی به روش Native و Denature شکافته شد و از کروماتوگرافی ترکیبی ستون نیکل استفاده گردید. بعد از انجام تخلیص برای تأیید تولید پروتئین نوترکیب آزورین وسترن بلات با آنتی‌بادی Anti His-Tag انجام شد (۱۶).

کشت سلولی:

رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و رده سلولی طبیعی (سلول‌های جنینی کلیه) HEK293 تهیه شد و از محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، سدیم پیرووات ۱۰۰ میلی مولار،g/l ۱/۵ سدیم بیکربنات و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنیسیلین- استرپتومایسین استفاده گردید و در انکوباتور (USA, BINDER)در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه گردید (۱۷).

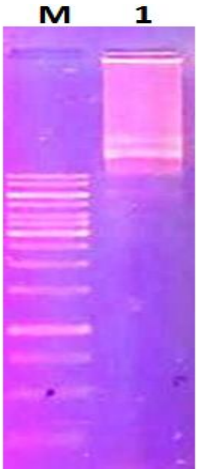
MTT assay:

از سلول‌هایی که به روش بالا کشت گردید به مقدار ۱۰۰۰۰۰ سلول (۵۰ ماکرولیتر) به‌طور مساوی داخل ردیف‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و رقت‌های ۱، ۲، ۳، ۶، ۱۳، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پروتئین به چاهک‌های حاوی سلول افزوده شد سپس ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اشباع و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه گردید. از محیط RPMI به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از انکوباسیون به میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید سپس ۲ ساعت داخل انکوباتور با شرایط بالا قرار گرفت و محیط رویی سلول‌ها خالی شد سپس محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید و بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب OD در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و برای آنالیز آماری از آزمون Mann-Whitney استفاده گردید.

یافته‌ها

تأیید پلاسمیدهای PET28a موجود در باکتری E.coli BL21(DE3):

پس از استخراج پلاسمیدها از باکتری‌های *E.coli* BL21 DE3 با استفاده از کیت شرکت (GeNet Bio)، محصولات حاصله بر روی ژل آگارز ۱درصد بررسی و وجود پلاسمیدها در باکتری مورد تأیید قرار گرفت که در شکل ۱ سه باند موردنظر قابل‌مشاهده است.

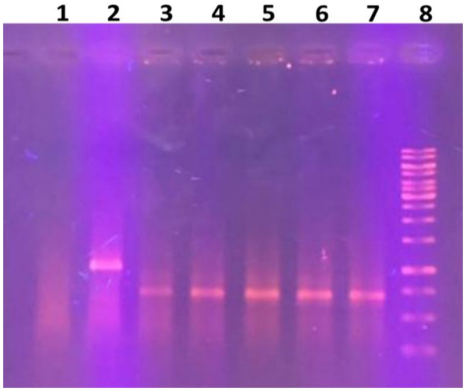


شکل (۱): تصویر ژل الکتروفورز پلاسمید PET28a تخلیص شده

ستون M: DNA نشانگر 1 kb، ستون ۱: پلاسمید PET28a تخلیص شده

تأیید انتقال pET28a-Azurin به میزبان کلونینگ TOP10:

پس از انتقال وکتور نوترکیب pET28a-Azurin به سلول مستعد TOP10، روی محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین (غلظت50 میکرولیتر) کشت داده شد سپس برای کلونی‌های TOP10 تراریخت شده‌ی حاوی pET28a، واکنش Colony PCR انجام شد و باندهای مورد انتظار در محدوده‌ی ۶۰۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل (۲): انتقال PET28a-Azurin به میزبان کلونینگ TOP10

۱-کنترل منفی نمونه فاقد الگو

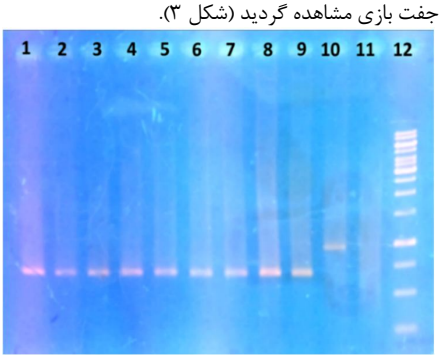
۲-کنترل مثبت pET28a حاوی یک ژن ۷۰۰ جفت بازی

۳ تا ۷- کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورم سویه TOP10 با پلاسمید حاوی pET28a-Azurin

۸- نشانگر وزن مولکولی DNA(1 kb)

تأیید انتقال pET28a-Azurin به میزبان بیانی BL21(DE3):

برای بیان پروتئین آزورین در باکتری، سازه pET28a-Azurin به درون سلول مستعد شده‌ی BL21(DE3) ترانسفورم شد و روی کلنی‌های تراریختی *EcoliBL21(DE3)* حاوی pET28a-Azurin، Colony PCR انجام گردید. محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفوزر شد و باندهای مورد انتظار در محدوده‌ی ۶۰۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل (۳): انتقال PET28a-Azurin به میزبان بیانی BL21(DE3)

۱ تا ۹-کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورم سویه Bl21(DE3) با پلاسمید حاوی pET28a-Azurin

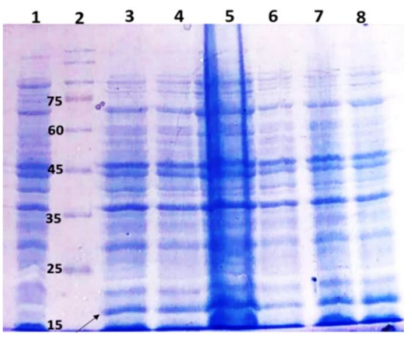
۱۰- کنترل مثبت pET28a حاوی یک ژن ۷۰۰ جفت بازی

۱۱- کنترل منفی نمونه فاقد الگو

۱۲- نشانگر وزن مولکولی DNA

غربالگری کلنی‌ها برای تأیید بیان پروتئین آزورین:

انجام فن SDS PAGE نشان داد که پروتئین نوترکیب ۱۹/۲ کیلو دالتونی آزورین در کلنی‌های منتخب بیان شده است که در شکل ۴ قابل‌مشاهده است.



شکل (۴): کنترل بیان

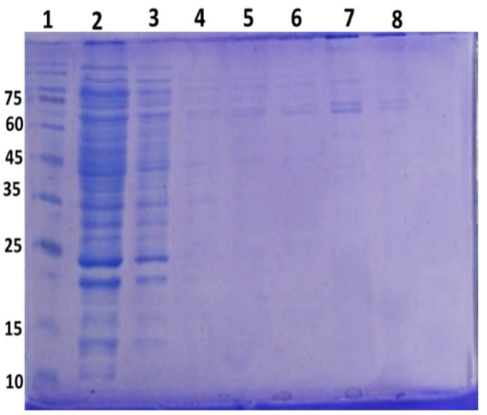
۱- نمونه باکتری قبل از القا با IPTG

۲- نشانگر وزن مولکولی پروتئین

۳ تا ۵ نمونه بیان کلونی، شماره ۱ و ۶ تا ۸ نمونه بیان کلونی شماره ۲ به ترتیب در فواصل زمانی ۲،۴ و ۲۴ ساعت پس از القا با IPTG یک میلی مولار

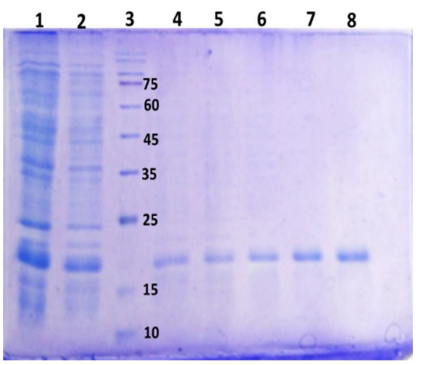
تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی ترکیبی نیکل (Ni-NTS):

تخلیص پروتئین نوترکیب نشان‌دار شده با His-tag به‌وسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. شکل ۵ تخلیص پروتئین نوترکیب آزورین در شرایط Native و شکل ۶ تخلیص پروتئین نوترکیب آزورین را در شرایط Denature نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود بیشتر پروتئین‌های نوترکیب موردنظر ما در فاز نامحلول (Denature) تخلیص شدند.



شکل (۵): تخلیص پروتئین آزورین در شرایط محلول (Native) روی ژلSDS-PAGE ۱۲درصد

چاهک ۱-نشانگر پروتئین، چاهک ۲- خروجی ستون پس از بارگذاری پروتئین، چاهک ۳- شستوشو توسط بافر، چاهک ۴ الی Elutions:۸



شکل (۶): تخلیص پروتئین آزورین در شرایط نامحلول (Denature) **روی ژل**SDS-PAGE ۱۲درصد

چاهک ۱- خروجی ستون پس از بارگذاری پروتئین، چاهک ۲- شست‌وشو توسط بافر حاوی اوره ۸ مولار، چاهک ۳- نشانگر پروتئین، چاهک ۴ الی ۸-Elutions

تأیید محصولات پروتئینی با فن Western Blotting:

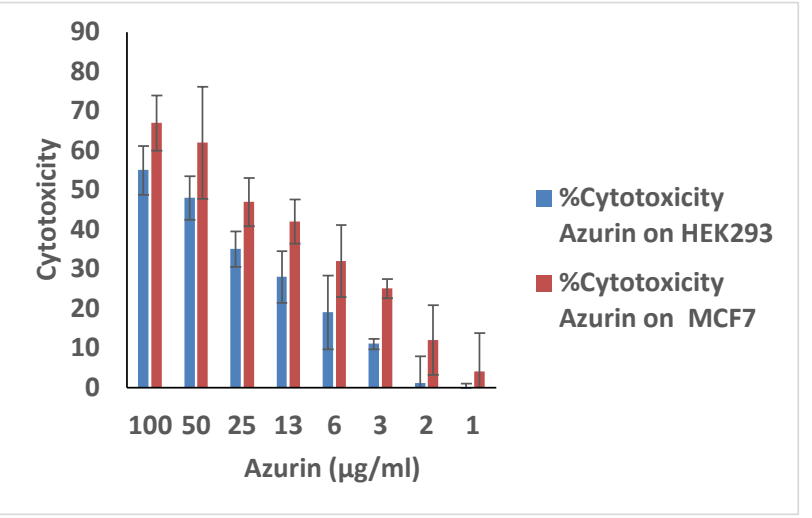
به‌منظور تأیید محصولات پروتئینی از فن Western Blotting استفاده شد. در شکل ۷ در ستون شماره ۳ یک باند در محدوده ۱۹ کیلو دالتون مشاهده شد که مربوط به پروتئین آزورین است.

شکل (۷): نتیجه وسترن بلاتینگ به‌منظور تأیید محصول پروتئین نوترکیب آزورین

ستون ۱) کنترل مثبت (لزوماً آزورین نیست و پروتئینی است که قبلاً در آزمایشگاه کار شده و جهت تأیید وسترن بلاتینگ استفاده شد)، ستون M) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) کنترل منفی، ۳) پروتئین نوترکیب تولیدشده

بررسی سمیت آزورین در رده سلولی MCF7 و رده سلولی HEK293:

نمودار (۱) بیانگر افزایش سیتوتوکسیستی و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت پروتئین آزورین است، بنابراین درصد سیتوتوکسیسیتی این پروتئین روی رده سلولی MCF7 با غلظت پروتئین نوترکیب ارتباط مستقیم و درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با غلظت پروتئین نوترکیب ارتباط معکوس دارد. همان‌طوری که در نمودار (۱) مشاهده می‌شود میزان سمیت آزورین در رده سلولی MCF7 بیشتر است. با توجه به $P<0.05$ بنابراین میزان سمیت آزورین در رده سلولی MCF7 با رده سلولی HEK293 برابر نیست.



نمودار (۱): سمیت آزورین در رده‌های سلولی **MCF7** و **HEK293** رشد یافته در پلیت ۹۶ خانه‌ای با غلظت‌های مختلف آزورین به مدت ۲۴ ساعت. همه‌ی نتایج به درصد بیان شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بدخیم زنان در سراسر دنیا است که امروزه به یکی از معضلات سازمان‌های بهداشتی تبدیل شده است. سرطان پستان حدود ۲۵ درصد از سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. در ایران مانند دیگر کشورهای درحال‌توسعه‌ی آسیا و آفریقا سرطان پستان زنان را حداقل یک دهه جوان‌تر از همتایان خود در کشورهای توسعه‌یافته تحت تأثیر قرار می‌دهد. در درمان سرطان پستان با توجه به شرایط بیمار از روش‌های مختلفی همچون جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شود. با توجه به عوارض روش‌های درمانی مذکور و میزان تأثیر این روش‌ها بر درمان بیماران و از طرف دیگر هزینه بالای این روش‌ها، نیاز مبرمی به استفاده از فنّاوری‌های نوین برای یافتن روش‌های جدید و پربازده با عوارض جانبی و هزینه کمتر برای درمان احساس می‌شود (۱۸). عدم اثر انتخابی علیه سلول‌های سرطانی یکی از مهم‌ترین ایراد درمان‌های متداول سرطان است. هدف‌گیری انحصاری سلول‌های غیرطبیعی، مرکز تلاش‌های جهانی در زمینه درمان سرطان بوده است (۱۹). در قرن‌های گذشته مشاهداتی در مورد پدیده‌ی برگشت خود به خودی تومورهای مرتبط با عفونت‌های باکتریایی وجود داشته است (۲۰). در اواخر سال ۱۸۹۰ پزشک آمریکایی کولی در مورد یک روند درمانی بر اساس این پدیده گزارش داد (۲۱). ارتباط بین عفونت باکتریایی و برگشت سرطان مشاهده شد. این مشاهدات او را به کشف یک واکسن باکتریایی کشته‌شده برای سرطان، معروف به توکسین کولی رساند (۲۰). سرانجام به توسعه‌ی روش‌های درمانی جدید ضد سرطان بر اساس استفاده از باکتری‌های زنده و محصولات تولیدشده به‌وسیله‌ی آن‌ها ازجمله سموم باکتریایی، پروتئین‌ها، پپتیدها و آنزیم‌ها جهت داد. اخیراً، تعدادی از پروتئین‌ها و پپتیدهای باکتریایی توصیف شده است که فعالیت ضد سرطانی را در سطح پیش بالینی نسبت به انواع مختلف سلول‌های سرطانی نشان می‌دهند (۲۲). اکتریوسین‌ها نشان داده‌اند که می‌توانند یک عامل درمانی فعال باشند و خواص بیوشیمیایی آن‌ها موردمطالعه قرار گرفته است. سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری بیماری‌زای گرم منفی دارای توانایی تولید پروتئین آزورین ضد سرطانی است. پروتئین آزورین می‌تواند به‌عنوان سلاحی برای حمله به سرطان‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها مورداستفاده قرار گیرد (۲۳). سمیت سلولی آزورین فقط برای سلول‌های سرطانی است و بر سلول‌های سالم تأثیر نمی‌گذارد و عوارض جانبی سمی کمتری دارد. تعداد فوق‌العاده‌ای از مواد درمانی می‌توانند به مولکول آزورین متصل شوند و آن به دلیل توانایی عمل به‌عنوان پروتئین حامل است (۲۴). داروهای شیمی‌درمانی امروزی که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند اغلب سمی هستند و مستعد ایجاد مقاومت توسط سلول‌های سرطانی هستند که درنهایت منجر به تومورهای مقاوم به دارو می‌شوند. توانایی آزورین در تداخل یا برگشت رشد تومور در نقاط مختلف حمله ممکن است در پیشگیری از پیشرفت مقاومت مؤثر باشد. از ویژگی چنین پروتئینی می‌توان به‌عنوان سلاحی برای افزایش طیف وسیعی از روش‌ها مانند فعالیت ضد سرطانی و ضد انگلی استفاده کرد. آزورین می‌تواند از القای تشکیل ضایعات پیش سرطانی جلوگیری کند. یک ماده سرطان‌زا می‌تواند باعث ایجاد ضایعه‌ی پیش سرطانی شود (۲۵). آزورین وارد سلول‌های سرطانی پستان می‌شود و باعث مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود. مرگ سلول‌های سرطانی با تشکیل کمپلکس با پروتئین شناخته‌شده‌ی p53 سرکوب‌کننده‌ی تومور صورت می‌گیرد. فرم پایدار پروتئین p53 همراه با فعال‌سازی کاسپازها باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۶). یافته‌های ما حکایت از سمیت آزورین در هر دو رده‌ی سلولی MCF7 و HEK293 دارد ولی سمیت آزورین روی رده سلولی MCF7 بیشتر است، به‌طوری‌که آزورین در کمترین غلظت دارای ۴درصد اثر سیتوتوکسیک روی رده سلولی MCF7 است و این حاکی از اثر انتخابی آزورین روی سلول‌های سرطانی است. گزارشات مختلفی از توان ضد سرطانی آزورین در مطالعات قبلی ارائه شده است. نفیسه پایدارنیا و همکاران اثر سمیت سینرژیسمی پروتئین هم جوش گرانزیم B– آزورین روی سلول‌های سرطانی پستان را اثبات کردند و اثر سیتوتوکسیک قابل‌توجه در سلول‌های MCF7 و MDA-MB-231 و SK-BR-3 مشاهده کردند درحالی‌که اثر سیتوتوکسیک قابل‌توجهی در سلول‌های طبیعی MCF10A مشاهده نکردند. Paydarnia و همکاران (۲۰۱۹) و Mohamed MS و همکاران (۲۰۱۰) اثر آزورین را به‌عنوان پروتئین ضد تومور در رده‌های سلولی سرطان نشان دادند و آزورین به‌شدت از تکثیر رده سلولی سرطان روده بزرگ HCT116 و رده سلولی سرطان پستان MCF7 جلوگیری کرد و آزورین هیچ تأثیری بر ملانوسیت‌های طبیعی HFB4 نشان نداد. Kim UK و همکاران اثر آزورین نوترکیب را در سلول‌های سرطان سنگفرش دهان اثبات نمودند و آزورین اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز در سلول‌های YD-9 نشان داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آزورین می‌تواند تا حدودی علیه سلول سرطانی گزینشی عمل کند و اثر ضدسرطانی بالقوه‌ای روی رده سلولی MCF7 داشته باشد.

تشکر و قدردانی:

از تمامی کسانی که ما را در این مطالعه یاری فرمودند تشکر و قدردانی می‌کنیم.

حمایت مالی:

ندارد.

تضاد منافع:

نویسندگان در این مطالعه هیچ تضاد منافعی نداشتند.

ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی برای انجام امور پژوهشی اقدام شده است.

References:

1. Van De KM, Mc S, Brunori M, Van BJ, Fc H, Gw C. Involvement of the hydrophobic patch of azurin in the electron-transfer reactions with cytochrome c551 and nitrite reductase. Eur J Biochem 1990;194(1):109-18. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19434.x
2. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Anti-cancer peptides from bacteria. Bangl J Pharmacol 2013;8(3):343-8. https://doi.org/10.3329/bjp.v8i3.15704
3. Fialho A, Das Gupta T, Chakrabarty A. Designing promiscuous drugs? Look at what nature made! Lett Drug Des Discov 2007;4(1):40-3. https://doi.org/10.2174/157018007778992946
4. Bernardes N, Seruca R, Chakrabarty AM, Fialho AM. Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects. Bioeng Bugs 2010;1(3):178-90. https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.10903
5. Yamada T, Hiraoka Y, Ikehata M, Kimbara K, Avner BS, Das Gupta TK, et al. Apoptosis or growth arrest: Modulation of tumor suppressor p53's specificity by bacterial redox protein azurin. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(14):4770-5. https://doi.org/10.1073/pnas.0400899101
6. Nguyen C, Nguyen VD. Discovery of azurin-like anticancer bacteriocins from human gut microbiome through homology modeling and molecular docking against the tumor suppressor p53. Biomed Res Int 2016;2016:8490482. https://doi.org/10.1155/2016/8490482
7. Gao M, Zhou J, Su Z, Huang Y. Bacterial cupredoxin azurin hijacks cellular signaling networks: Protein-protein interactions and cancer therapy: Azurin Hijacks Cellular Signaling Networks. Protein Sci 2017;26(12):2334-41.. https://doi.org/10.1002/pro.3310
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Int Agency for Res on Cancer 2012.
9. Nooshinfar E, Bashash D. Melatonin and its importance in breast cancer prevention and treatment (A purposed review article). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2014;17:10-21.
10. Dao KL, Hanson RN. Targeting the estrogen receptor using steroid-therapeutic drug conjugates (hybrids). Bioconjug Chem 2012b;23(11):2139-58. https://doi.org/10.1021/bc300378e
11. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis 2018;5(2):77-106. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001
12. Mehta RR, Yamada T, Taylor BN, Christov K, King ML, Majumdar D, et al. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt. Angiogenesis 2011;14(3):355-69. https://doi.org/10.1007/s10456-011-9220-6
13. Bernardes N, Ribeiro AS, Abreu S, Mota B, Matos RG, Arraiano CM, et al. The bacterial protein azurin impairs invasion and FAK/Src signaling in P-cadherin-overexpressing breast cancer cell models. PLoS One 2013;8(7):e69023. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069023
14. Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Chen ML, Kimbara K, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(22):14098-103.. https://doi.org/10.1073/pnas.222539699
15. Fialho AM, Bernardes N, Chakrabarty AM. Exploring the anticancer potential of the bacterial

redox protein azurin in mammalian cells: entry domain and specificity. Cell Microbiol 2005;7(10):1418-31. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00567.x

24. Mahfouz M, Hashimoto W, Gupta TK, Chakrabarty AM. Bacterial proteins and CpG-rich extrachromosomal DNA in potential cancer therapy. Plasmid 2007;57(1):4-17. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.11.001
25. Tangri S, Ishioka GY, Huang X, Sidney J, Southwood S, Fikes J, et al. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. J Exp Med2001;194(6):833-46. https://doi.org/10.1084/jem.194.6.833
26. Vijgenboom E, Busch JE, Canters GW. In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in Pseudomonas aeruginosa and show that azu expression is under control of rpoS and ANR. Microbiology 1997;143 (Pt 9)(9):2853-63. https://doi.org/10.1099/00221287-143-9-2853
27. Paydarnia N, Khoshtinat Nikkhoi S, Fakhravar A, Mehdiabdol M, Heydarzadeh H, Ranjbar S. Synergistic effect of granzyme B-azurin fusion protein on breast cancer cells. Mol Biol Rep 2019;46(3):3129-40. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04767-x
28. Mohamed MS, Said A, Howayada M. Azurin as antitumor protein and its effect on the cancer cell lines. Curr Res J Biol Sci 2010; (2):396-401.
29. Kim UK. Recombinant Azurin from Pseudomonas aeruginosa Induces Apoptotic Cell Death in Oral Squamous Carcinoma Cells. Int J Oral biology 2010;2:35-42.

protein azurin. Aims Microbiol 2016;2(3):292-303. https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.3.292
16. Taherimehr Z, Zaboli M, Torkzadeh-Mahani M. New insight into the molecular mechanism of the trehalose effect on urate oxidase stability. J Biomol Struct Dyn 2022;40(4):1461-71. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1828167
17. Shandiz SAS, Sharifian F, Behboodi S, Ghodratpour F, Baghbani-Arani F. Evaluation of metastasis suppressor genes expression and in vitro anti-cancer effects of Zinc Oxide Nanoparticles in human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D. Avicenna J Med Biotechnol 2021;13(1):9-14.
18. Ghodratpour F, Fahimeh, Shandiz S. Cytotoxic effects of Zn oxide nanoparticles against breast cancer T47D cells and NM23 gene expression. Feyz 2018;6:589-94.
19. Bar-Zeev M, Livney YD, Assaraf YG. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. Drug Resist Updat 2017;31:15-30.. https://doi.org/10.1016/j.drup.2017.05.002
20. Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, Weiss S. Bacteria in cancer therapy: Renaissance of an old concept. Int J Microbiol 2016;2016:8451728. https://doi.org/10.1155/2016/8451728
21. Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann Surg 1891;14:199-220. https://doi.org/10.1097/00000658-189112000-00015
22. Chakrabarty AM, Bernardes N, Fialho AM. Bacterial proteins and peptides in cancer therapy: today and tomorrow: Today and tomorrow. Bioengineered 2014;5(4):234-42. https://doi.org/10.4161/bioe.29266
23. Yamada T, Fialho AM, Punj V, Bratescu L, Gupta TK, Chakrabarty AM. Internalization of bacterial

Original Article

EVALUATION OF ANTICANCER EFFECT OF RECOMBINANT AZURIN TOXIN ON BREAST CANCER CELL LINE

Hasan Rahimi Saatlou[1], Bahram Golestani Imani[2]

Received: 09 October, 2021; Accepted: 04 February, 2024

Abstract

Background & Aims: Breast cancer is the most common type of malignancy among women. Today, various methods of chemotherapy, surgery, and radiation therapy are used to treat cancer. However, among the disadvantages and side effects of these methods are the destruction of normal cells. This has led researchers to turn to new treatment methods with low side effects. Azurin is a direct bacterial redox metalloprotein with cytotoxic effects produced by Pseudomonas aeruginosa. Recombinant azurin toxin can be used to treat breast cancer by reducing side effects on normal cells. The aim of this study was to evaluate the anticancer effect of recombinant azurin toxin on breast cancer cell line.

Materials & Methods: In this experimental study, after cloning and expression of recombinant azurin in E. coli, the cytotoxic effect of different concentrations of azurin on MCF7 breast cancer cells and normal HEK293 cells was evaluated by MTT assay.

Results: Azurin at all concentrations and even at a concentration of 1 mg/ml had a potential cytotoxic effect on MCF7 cell line than HEK293 cell line. The increase in cytotoxicity and decrease in the survival of cancer cells was associated with the increase in the concentration of azurin protein; therefore, the percentage of cytotoxicity of this protein in the MCF7 cell line was directly related to the concentration of recombinant protein, and the percentage of survival of cancer cells was inversely related to the concentration of recombinant protein.

***Conclusion*:** The results of this study showed that azurin can partly act selectively against breast cancer cell. These findings are hopeful for the use of azurin as a new and low-cost therapeutic agent for the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Cloning, Escherichia Coli, Pseudomonas, Recombinant Azurin

Address: Department of Biology, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
Tel: +989128095377
Email: golestani_bahram@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024: 34(11): 683 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] *MSc in Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran*
[2] *Assistant Professor of Genetics, Department of Biology, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*