

بررسی اثر ضدسرطانی لانتی بیوتیک Lacticin 3147

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰

خلاصه

مقدمه

بیشترین نوع سرطان مربوط به سرطان پوست بخصوص در مردان است. Lacticin 3147 با کتریوسینی از خانواده لانتی بیوتیک‌هاست. هرچند هنوز شواهدی برای اثرات ضدسرطانی آن گزارش نشده است، به دلیل مشابهت به نایسین برای بررسی این اثر در نظر گرفته شد. هدف بررسی اثر Lacticin 3147 بود.

روش کار

ابتدا سلول‌های A431 کشت داده شدند و سنجش بقای سلولی و میزان سمیت سلولی Lacticin 3147 بر سلول‌های کارسینوما ایپیدرموئید انسانی A431 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار توسط روش رنگ سنجی MTT Assay بررسی شد. آپوپتوز سلولی با سنجش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی A431 تیمار شده با غلظت Lacticin 3147 IC₅₀ پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. از روش Boyden Chamber جهت ارزیابی توانایی مهاجم سلول‌های سرطانی A431 تیمار شده با دوز زیرکشنده Lacticin 3147 استفاده شد. آغاز گره‌های اختصاصی برای ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax، آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و ژن مرجع β -actin طراحی و میزان بیان آن‌ها در سلول‌های A431 تیمار شده با غلظت Lacticin 3147 IC₅₀ با استفاده از روش Real Time PCR کمی، مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون آماری ANOVA انجام گردید (P < ۰/۰۵).

نتایج

بررسی آماری داده‌های به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که رشد سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف Lacticin 3147 به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (p < ۰/۰۰۱). تأثیر مهارتی Lacticin 3147 بر زنده‌مانی سلول‌های A431 وابسته به غلظت و زمان تیمار است. به‌طوری‌که بیشترین تأثیر در غلظت ۰/۳ μ M و مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد. غلظت Lacticin 3147 IC₅₀ برابر با ۰/۸ μ M به دست آمد. فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی A431 تیمار شده به صورت وابسته به زمان افزایش یافت و پس از ۷۲ ساعت نسبت به کنترل به ترتیب ۲/۳۶ و ۲/۷۲ برابر شد (p < ۰/۰۰۱). توان مهاجم سلول‌های سرطانی A431 تیمار شده با دوز زیرکشنده Lacticin 3147 به‌طور وابسته به دوز کاهش یافت و در غلظت ۰/۵ μ M با حداقل اثر کشنده‌گی، کمترین توان مهاجم را نشان داد (p < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری

بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax در سلول‌های A431 تیمار شده با غلظت Lacticin 3147 IC₅₀ به‌طور قابل ملاحظه‌ای (p < ۰/۰۰۱) افزایش یافت. همچنین کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 در همان شرایط معنی‌دار بود. در نتیجه، استفاده از Lacticin 3147 در آینده ممکن است به یک استراتژی جدید برای درمان سرطان پوست منجر شود.

کلمات کلیدی

Lacticin 3147، کارسینوما ایپیدرموئید

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مهديه جواهریان^۱

روناک بختیاری^{۲*}

هاتف آجودانی فر^{۳*}

امیر میرزایی^۴

^۱ دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی،

واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

^۲ دانشیار بیوشیمی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار قارچ شناسی، گروه زیست شناسی، واحد دامغان،

دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. (نویسنده مسئول)

^۴ گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند،

ایران

Email:

rounakbakhtiari@yahoo.com

Ajoudanifar@damghaniau.ac.ir

مقدمه

در ایران سرطان سومین عامل مرگ و میر است و سالانه بیش از ۳۰۰۰۰ نفر در کشور جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند و انتظار می‌رود موارد بروز سرطان در دهه آینده به دو برابر افزایش یابد. تخمین زده می‌شود که بیش از یک سوم تمام موارد سرطان‌ها قابل پیشگیری و یک سوم دیگر به شرط تشخیص زود هنگام، بالقوه درمان‌پذیر می‌باشند (۱).

سرطانی شدن یک فرایند چند مرحله‌ای است و از طریق تغییرات ژنتیکی، مسیرهای سیگنالینگ مختلفی راه‌اندازی یا مهار می‌شوند و نهایتاً باعث تغییر پیش‌رونده در تبدیل سلول‌های نرمال به سلول‌های سرطانی می‌شود که در آن سلول‌های بدخیم سرطانی تشکیل می‌شوند و توانایی تهاجم به بافت‌های اطراف را دارند (۱). علی‌رغم این که سرطان پوست شایع‌ترین سرطان در ایران است، اما اپیدمیولوژی آن در کشور به‌طور منظم مرور نشده و مطالعات انجام شده در این زمینه محدود و پراکنده است.

افزایش بروز و عوارض سرطان سلول‌های سنگفرشی پوست (Squamous Cell Carcinoma) SCC، تمایل زیادی به کشف پاتوژنز آن‌ها و جستجوی درمان‌های غیرتهاجمی‌تر وجود دارد که کارایی بالا، عوارض جانبی کم و کاربرد آسان داشته باشد (۱). اپیدمیولوژی سرطان پوست در سال ۲۰۲۰ در جهان ۱،۱۹۸،۰۷۳ مورد جدید و ۶۳،۷۳۱ مرگ در سراسر جهان، با میزان بروز تقریباً ۲ برابر در مردان بیشتر از زنان گزارش شده است (۲). کارسینومای سلول‌های سنگفرشی پوست اغلب در نقاطی از بدن که بیشتر در معرض آفتاب قرار گرفته‌اند، مانند صورت، گوش‌ها و دست‌ها مشاهده می‌شود (۳).

لانتی‌بیوتیک‌ها پپتیدهای ضد میکروبی با سنتز ریبوزومی هستند که در معرض تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند. Lacticin 3147 متعلق به زیرگروه باکتریوسین‌ها به نام لانتی‌بیوتیک با ۱۲۴ اسید آمینه (۵۹+۶۵) است که توسط باکتری *Lactococcus lactis* DPC3147 تولید می‌شود و

یک پری‌بیوتیک دو پپتیدی ($Ltn\beta$ و $Ltn\alpha$) است (۴). چندین آنتی‌بیوتیک که با Lacticin 3147 اثر هم‌افزایی دارند شناسایی شده‌اند. با این که اثر ضدسرطانی Lacticin 3147 تاکنون مشخص نشده‌است، نشان داده شده که با کاهش یا تغییر تحرک اسپرم‌های انسان، اثر اسپرم‌کشی از خود نشان می‌دهد (Silkin et al. 2008). لذا می‌توان متصور شد که Lacticin 3147 علاوه بر پروکاریوت‌ها، احتمالاً بر یوکاریوت‌ها نیز اثر می‌گذارد. احتمالاً پتانسیل کاربرد باکتریوسین‌ها از جمله Lacticin 3147 در درمان سرطان به مهار سنتز DNA و پروتئین‌های غشایی مرتبط است که باعث آپوپتوز یا سمیت سلولی در سلول‌های نئوپلاستیک می‌شود (۵). این پژوهش با هدف بررسی اثر ضدسرطانی Lacticin 3147 بر سلول‌های سرطان پوست آغاز شد.

روش کار

کشت سلول‌های سنگفرشی سرطان پوست (Squamous Cell Carcinoma) A431
 رده سلولی کارسینوم اپیدرموئید A431 (CRL-1555) خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین (Gibco, Invitrogen, Germany) کشت و در فشار یک اتمسفر و ۵٪ CO_2 در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد.

بررسی بقا سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف Lacticin 3147

لانتی‌بیوتیک Lacticin 3147 (BioTek, USA) خریداری و با غلظت مشخص در PBS حل شد. برای بررسی اثرات ضدسرطانی این ماده در هرچاهک پلیت ۹۶-خانه حدود 3×10^3 سلول سرطانی A431 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با غلظت‌های مختلف ۰/۱ تا ۱ میکرومولار، Lacticin 3147 مواجه شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اثرات سایتوتوکسیک این ماده و ترکیب آن‌ها بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی A431 توسط تست MTT بررسی شد. به‌طور خلاصه، ۱۵ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم از پودر MTT (Sigma, Germany) در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS در

Lacticin 3147 به حفره بالایی چاهک در محیط کشت فاقد FBS اضافه شد، درحالی که حفره پایین هر چاهک، حاوی محیط کشت ۱۰٪ FBS است. سلول‌های سرطانی که توانایی مهاجم داشته باشند از غشا عبور کرده و توسط بافر جداکننده از غشا جدا شدند. سلول‌ها توسط رنگ فلورسنت و تهیج در طول موج ۴۸۰ نانومتر ردیابی شدند. نور ساطع شده توسط سیستم فلورسنت پلیریت ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. شدت نور به دست آمده با تعداد سلول‌های عبوری از غشا متناسب با سلول‌های مهاجم یا متاستاتیک بود.

تجزیه و تحلیل بیان برخی از ژن‌های سرطانی

میزان بیان ژن پروآپوپتوزی *Bax* و ژن آنتی آپوپتوزی *Bcl-2* در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} Lacticin 3147، نسبت به ژن مرجع β -actin توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا استخراج RNA از سلول توسط کیت استخراج RNA (پارس‌توس، ایران) و سنتز cDNA با استفاده از کیت (پارس‌توس، ایران) طبق دستورالعمل کیت‌ها انجام شد. به منظور انجام واکنش PCR Time-Real، حجم نهایی هر میکروتیوپ، ۲۰ میکرولیتر شد که حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای پیشرو و پیرو مربوط به هر ژن، ۴۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میکرولیتر Master Mix و ۷ میکرولیتر آب RNase free بود. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر (*Bcl-2* و *Bax* و β -actin) توسط نرم‌افزار Allele ID طراحی شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

هر چاهک اضافه شده و انکوبه گردید. پس از ۳ ساعت، به هر چاهک پلیریت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط میکروپلیریت خوان (Biorad) ثبت گردید.

بررسی آپوپتوز با سنجش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹

به منظور ارزیابی کمی آپوپتوز، فعالیت آنزیماتیک کاسپازهای ۸ و ۹ با استفاده از روش‌های رنگ سنجی صورت گرفت. تعداد ۱۰^۶ سلول A431 در هر چاهک ۶-خانه به نام گروه تست (تیمار با غلظت IC_{50}) و گروه کنترل به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس سلول‌ها ترپسینه شده و به مدت یک ساعت در ۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده انکوبه شدند. پس از لیز سلولی، پروتئین‌های سیتوزولی استخراج شده با بافر واکنش و ۵ میکرولیتر از سوسترای کاسپاز ۸ و سوسترای کاسپاز ۹ (LEHD-pNA) جداگانه انکوبه شد و جذب نوری رنگ محصول به دست آمده در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. افزایش فعالیت کاسپازها با مقایسه نتایج گروه تست با گروه کنترل تیمار نشده گزارش شد.

بررسی مهاجرت سلولی به روش Boyden Chamber

برای بررسی پتانسیل متاستاز سلول‌های A431 پس از مواجهه دوز بهینه Lacticin 3147 از تست Boyden Chamber استفاده شد. به این منظور، ۱۰^۶ سلول A431 در پلیریت مدل غشای پایه (ECMatrix) کشت داده شد. در گروه‌های کنترل و تست تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۰/۱ تا ۱ میکرومولار

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه

ژن	پرایمر پیشرو	پرایمر پیرو	kb قطعه
β -actin	5'-TCACCCACACACTGTTGCCATCTAGA-3'	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'	306
Bcl-2	5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3'	5'-CAGGCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'	122
Bax	5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'	5'-AGCTTCTTGGTGGACGCATC-3'	101

نتایج

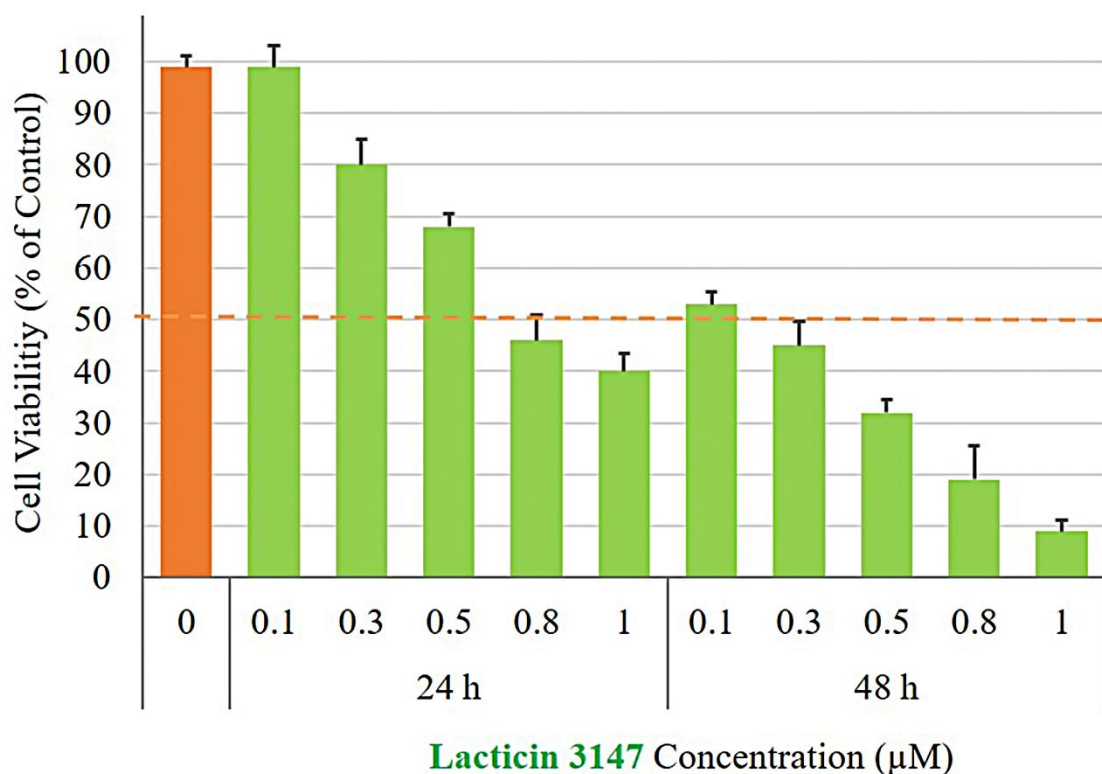
زنده‌مانی سلول‌های سرطانی A431 به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافت

اثرات سایتوتوکسیک Lacticin 3147 بر روی سلول‌های A431 به روش MTT تعیین شد. نتایج نشان داد که مرگ سلول‌های A431 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف Lacticin 3147 (۱ تا ۱ میکرومولار) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت اتفاق افتاد. IC_{50} پری بیوتیک Lacticin 3147 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، به ترتیب ۰/۸ و ۰/۳ میکرومولار بود. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، القای مرگ سلولی توسط Lacticin 3147 به صورت وابسته به زمان با روند خطی افزایش می‌یابد و پس از ۴۸ ساعت به حداکثر خود (بیش از ۹۰٪ مرگ سلولی) می‌رسد و همچنان معنی‌دار است.

تست Real-time PCR با استفاده از ترموسایکلر Rotor-Gene Q (Corbett) و مسترمیکس SYBR-Green (Applied Biosystems) (به صورت $94^{\circ}C$ به مدت ۱۲ دقیقه، مرحله دوم $94^{\circ}C$ به مدت ۲۰ ثانیه و $57^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله آخر دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه) انجام شد. در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با مقایسه نتایج به دست آمده از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده محاسبه شد.

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه p با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. همچنین، مقادیر $p < 0.05$ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

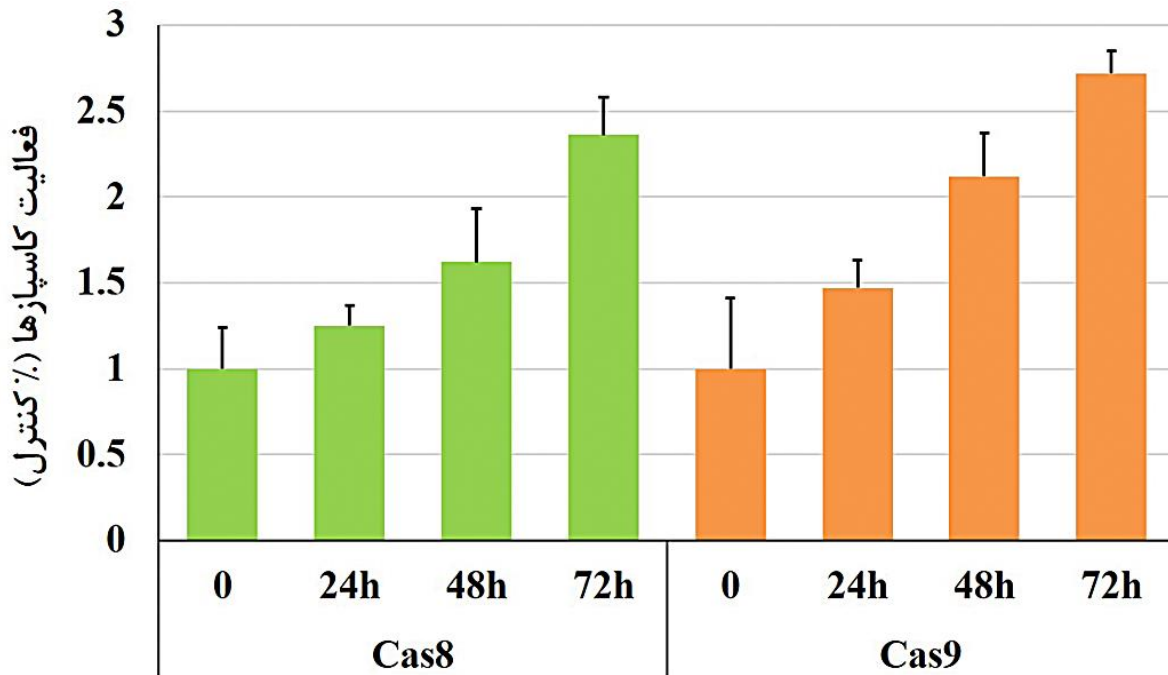


شکل ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی A431 تحت تأثیر Lacticin با استفاده از روش MTT. سلول‌ها با دوزهای مختلف Lacticin (از ۰/۱ تا ۱ میکرومولار) تیمار شدند و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نوارهای خطی نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه گانه است.

فعال سازی کاسپازهای ۸ و ۹ در مسیر القای آپوپتوز توسط Lacticin 3147

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول های A431 تیمار شده با

غلظت (IC₅₀) ۰/۸ میکرومولار Lacticin 3147 در مقایسه با فعالیت آن ها در گروه کنترل به صورت وابسته به زمان افزایش داشت. هم چنین بیشترین میزان فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ پس از ۷۲ ساعت به ترتیب ۲/۳۶ و ۲/۷۲ برابر شد.

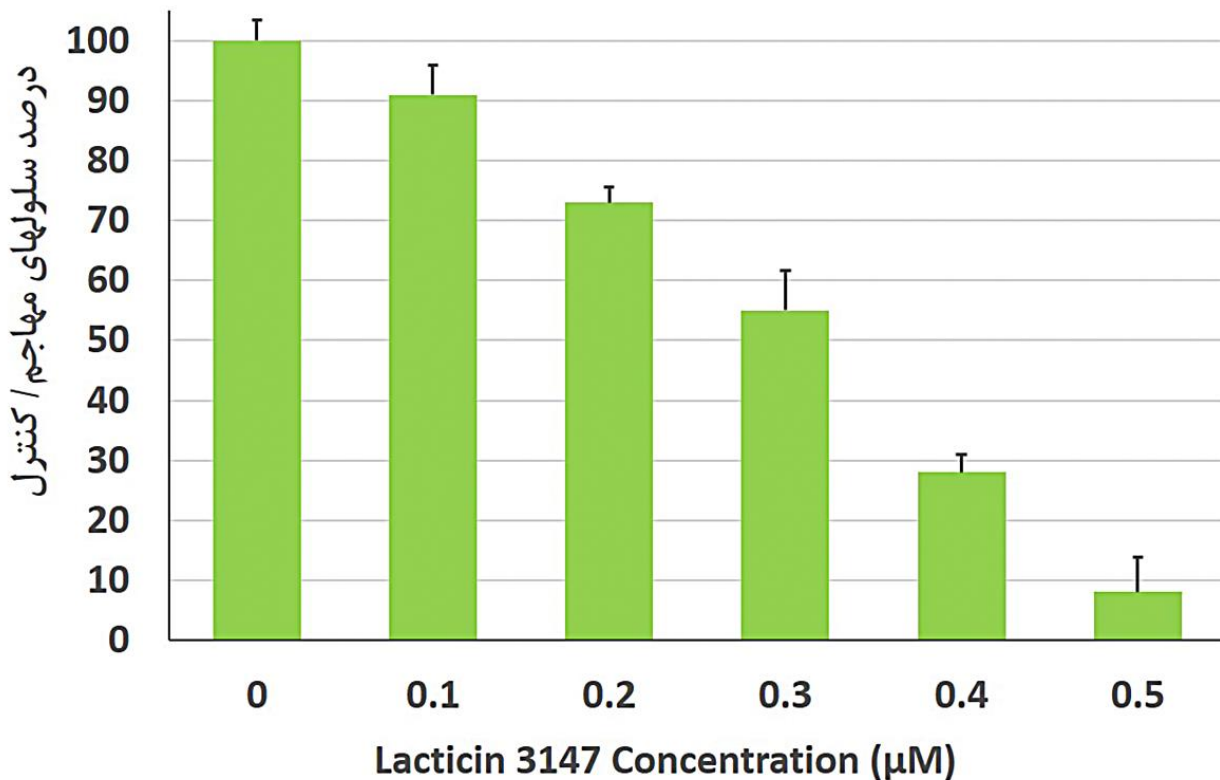


شکل ۲. تأثیر Lacticin 3147 بر فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در A431. سلول ها با غلظت IC₅₀ Lacticin 3147 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در سلول های A431 به صورت وابسته به زمان افزایش داشت. تست آماری Tukey's post hoc تفاوت معنی داری در میزان فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ در غلظت ۰/۸ میکرومولار Lacticin 3147 نشان داد ($p < 0.001$).

بررسی اثر Lacticin 3147 بر توان تهاجم سلول های A431

ظرفیت مهاجرت که نشان دهنده پتانسیل تهاجم و متاستاز سلول های سرطانی است می تواند در برخی از ریزمحیط ها در میان این انواع سلول ها متفاوت باشد. در این روش تعداد سلول های A431 عبور کرده از غشای پایه مدل (مهاجم) با

شدت نور به دست آمده متناسب است. با توجه به نتایج، پری بیوتیک Lacticin 3147 در غلظت های زیر کشنده توان تهاجم سلول های A431 را به طور وابسته به دوز در *In vitro* مهار کرد. به طوری که در غلظت ۰/۵ μM با حداقل اثر کشندگی، کمترین توان تهاجم را نشان داد ($p < 0.001$).



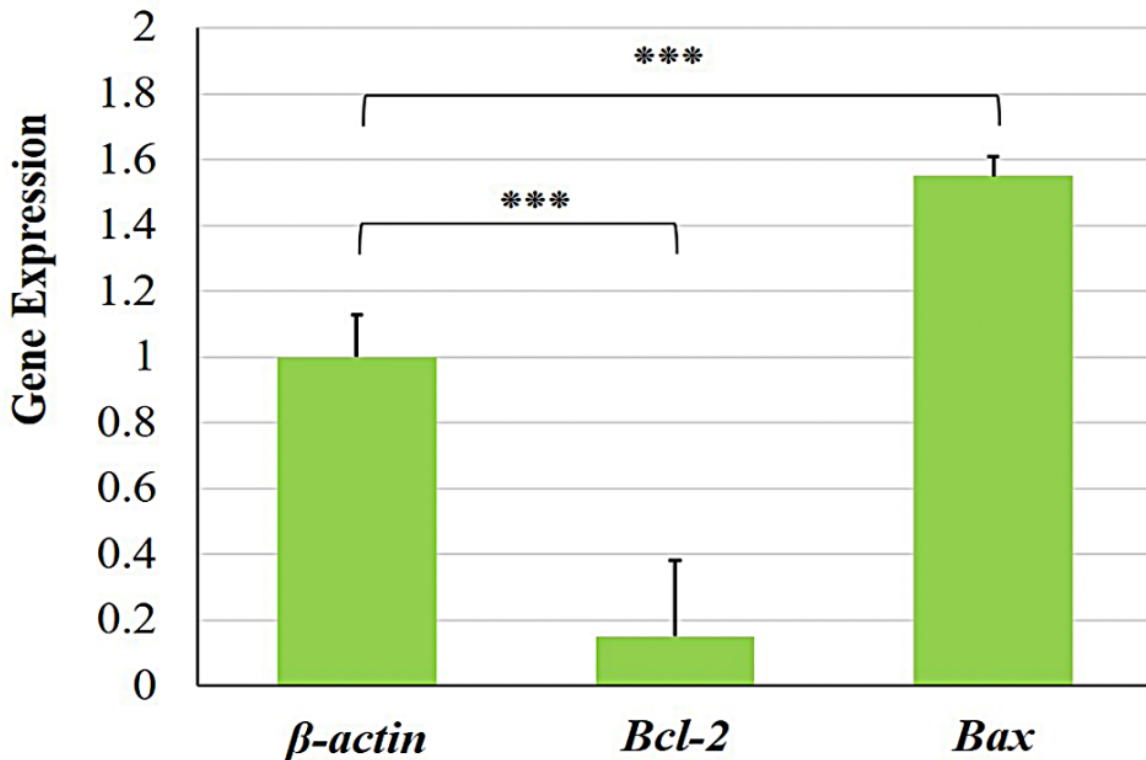
شکل ۳. Lacticin 3147 در غلظت‌های زیرکشنده به‌طور قابل توجهی مهاجرت سلول‌های A431 را، بدون اثر سمیت قوی، مهار کرد ($p < 0.001$).

شده، تعداد کپی ژن‌های انتخاب شده نسبت به *actin*- \square اعلام شد.

تفاوت بیان ژن پروآپوپتوزی *Bax* و ژن آنتی‌آپوپتوزی *Bcl-2* در سلول‌های A431 تیمار شده با Lacticin 3147 نسبت به کنترل معنی‌دار بود. دوز IC_{50} پری‌بیوتیک Lacticin 3147 به‌طور قابل توجهی ژن *Bax* را حدود ۱/۵۵ برابر در سلول‌های A431 افزایش داد ($p < 0.001$). در حالی که، بیان *Bcl-2* کاهش قابل توجهی حدود ۱۰ برابر ($p < 0.001$) داشت.

اثر Lacticin 3147 بر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های A431

پیامدهای بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* اثربخشی Lacticin 3147 را در القای آپوپتوز در سلول‌های A431 تقویت کرد. الگوی بیان ژن‌های مذکور پس از تیمار سلول‌های A431 با غلظت‌های بهینه Lacticin 3147 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. یافته‌ها به‌صورت مقادیر نرمال



شکل ۴. ارزیابی بیان ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* در سلول‌های A431 تیمار شده با Lacticin 3147 به روش RT-qPCR. ژن پروآپوپتوزی *Bax* به طور قابل توجهی در سلول‌های A431 تیمار شده با Lacticin 3147 حدود ۱/۵۵ برابر بیان شد ($p < 0.001$). در حالی که بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی *Bcl-2* را حدود ۱۰ برابر ($p < 0.001$) کاهش داد. نوارهای خط نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه گانه است. اختلاف آماری با معنی‌داری $p < 0.001$ (***)، $p < 0.01$ (**)، $p < 0.05$ (*) نشان داده شد.

شده‌اند (۹). لذا همواره محققین به دنبال روشی برای کاهش دوز مصرفی این داروها بوده‌اند. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدسرطانی Lacticin 3147 در درمان سرطان پوست با استفاده از رده سلولی سرطانی درماتوئید A431 در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

برای رسیدن به میزان زنده‌مانی، مرگ سلولی و ارزیابی مهاجرت سلولی، لازم است سنجش‌های مختلفی مانند فعالیت سایتوتوکسیک، تهاجم و آپوپتوز انجام شود (۱۰-۱۳). اثرات سایتوتوکسیک Lacticin 3147 بر روی سلول‌های A431 از طریق روش MTT در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. IC_{50} سلول‌های تیمار شده با Lacticin 3147 پس از ۲۴ ساعت ۰/۸ میکرومولار بود که مرگ سلولی را به صورت وابسته به غلظت و زمان با روند خطی القاء کرد و پس از ۴۸ ساعت به حداکثر خود رسید. پیش‌تر

بحث

اگرچه شیمی‌درمانی نقش بسیار مهمی در درمان سرطان داشته است، با این حال استفاده از داروهای ضدسرطان بر روی بافت نرمال هم اثر نامطلوب می‌گذارد. درمان سرطان با استفاده از داروهای شیمی‌درمانی با توجه به سمیت آن‌ها، به ویژه کاردیوتوکسیسیته تجمعی وابسته به دوز و نیز به علت توسعه مقاومت در برابر دارو باید محدود شود (۶، ۷). برخی با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب آسیب به غشاء میتوکندری، آزاد شدن سیتوکروم C و در نتیجه القاء آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها می‌شود (۶، ۷). آزاد شدن سیتوکروم C به وسیله خانواده پروتئین‌های Bcl-2 که در غشاء داخلی میتوکندری واقع شده‌اند؛ کنترل می‌شود (۸). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 از دو گروه آنتی‌آپوپتوتیک شامل Bcl-2 و Bcl-XL و پروآپوپتوتیک شامل Bid، Bax و Bad تشکیل

(۲۱). این پژوهش با بررسی آپوپتوز سلول‌ها و سنجش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ نشان داد که تیمار سلول‌های A431 با $0.8/3147 \mu\text{M}$ Lacticin پس از ۷۲ ساعت، فعالیت کاسپاز ۸ را بیش از ۲ برابر و کاسپاز ۹ را بیش از ۲/۵ برابر افزایش داد. پری‌بیوتیک Lacticin 3147 می‌تواند اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی در ماتوئید اعمال کند که حداقل بخشی از این اثر از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ میانجی‌گری می‌شود. همچنین اختلال در نسبت *Bax/Bcl-2* تنظیم می‌کند و سیتوکروم C، کاسپاز ۸ و ۹ را افزایش می‌دهد و باعث القای آبشارهای کاسپاز می‌شود.

تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی مرحله مهمی از متاستاز است که دلیل اولیه مرگ و میر بیماران مبتلا به تومورهای جامد است (۱۰). در سال ۲۰۱۱ Lin و همکاران از روش Boyden Chamber برای آزمایش اثر فلاونوئیدها بر توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی A431 استفاده کردند. تیمار با Luteolin و Quercetin (۱۰ و ۲۰ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت) باعث مهار قابل توجهی از توانایی تهاجمی سلول‌های A431 شد (۲۲). در سال ۲۰۰۵ Muller و همکاران به کمک تست تهاجم Boyden Chamber نشان دادند که Alendronate، مولکولی بسیار قوی است، و تهاجم سلولی A431 را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند (۲۳). در سال ۲۰۱۸ Sun، و همکاران متوجه شدند که Myricetin به طور قابل توجهی تحرک و مهاجرت سلول‌های A431 را به صورت وابسته به دوز کاهش داد و تا ۶۶٪ از تهاجم سلول‌های A431 جلوگیری کرد (۲۴). در این تحقیق، پتانسیل Lacticin 3147 برای جلوگیری از تهاجم یا متاستاز تومور در شرایط آزمایشگاهی در رده سلولی A431 انسانی توسط تست Boyden Chamber، بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده، پری‌بیوتیک Lacticin 3147 در غلظت‌های زیرکشنده (از $0.5 \mu\text{M}$ تا $5 \mu\text{M}$) توان تهاجم سلول‌های A431 را به طور وابسته به دوز در *In vitro* مهار کرد. به طوری که در غلظت $0.5 \mu\text{M}$ با حداقل اثر کشندگی، توان تهاجم را تا ۸٪ کاهش داد ($p < 0.001$).

پتانسیل سایتوتوکسیک مواد مختلفی در برابر سلول‌های A431 بررسی شده است. در مطالعه‌ای گزارش شد که نسبت آپوپتوز در حضور ۱۰ و ۲۰ میکرومولار Oridonin به ترتیب $14\%/83$ و $21\%/08$ در ۲۴ ساعت افزایش یافت (۱۴). مطالعه دیگری اشاره کرد که ۳ تا ۵۰ میکرومولار لوتولین (IC_{50}) از گسترش چندین نوع سلول تومور در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند (۱۵). همچنین، مطالعه آزمایشگاهی دیگری نشان داد که درمان ترکیبی سلول‌های سرطانی با نانوذرات حاوی لوتولین و دوکسوروبیسین می‌تواند بالاترین درصد مرگ سلولی را القا کند (۱۶). برخلاف برخی گزارش‌ها که نشان می‌دهند که Lacticin 3147 برای سلول‌های یوکاریوتی غیرسمی است (۱۷)، ما متوجه مهار تکثیر A431 در غلظت میکرومولار Lacticin 3147 شدیم. بنابراین، Lacticin 3147 دارای خواص ضدسرطانی نسبت به سلول‌های بدخیم و فعالیت ناچیز در برابر سلول‌های غیرسرطانی است.

آبشار آپوپتوز کلاسیک از طریق دو مسیر فعال می‌شود: یک مسیر بیرونی با واسطه کاسپاز ۸ و یک مسیر درونی تنظیم شده توسط کاسپاز ۹ (۱۸). در سال ۲۰۰۹ Zhang و همکاران نشان دادند که سارکوفین-دیول می‌تواند فعالیت کاسپازهای ۸ و ۹ را در سلول‌های A431 القا کند. تیمار A431 با سارکوفین-دیول $400 \mu\text{M}$ به مدت ۴۸ ساعت به طور قابل توجهی ($p < 0.05$) باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۸ حدود ۲ برابر نسبت به کنترل شد، در حالی که تیمار با سارکوپین-دیول $400 \mu\text{M}$ به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۹ قابل ملاحظه‌ای نشد (۱۹). مطالعه Chung و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر پری‌بیوتیک اینولین را بر سلول‌های دندریتیک نشان دادند که می‌تواند باعث سرکوب پروتئین لنفوم سلول B-2 (*Bcl-2*)، فعال‌سازی کاسپازها و مرگ سلولی و آپوپتوز سلول‌های دندریتیک شود (۲۰). در ۲۰۲۱، Juszczak و همکاران نشان دادند که تیمار رده سلولی C32 با $95/1 \mu\text{g/ml}$ پری‌بیوتیک لوتولین به مدت ۲۴ ساعت با فعال کردن کاسپازهای ۸، ۹، ۱۰ و ۳ باعث القای آپوپتوز می‌شود

مهار آنتی آپوپتوز، مرگ سلولی افزایش می‌یابد. Lacticin 3147 موجب حدود ۱/۵ برابر افزایش بیان ژن *Bax* ($p < 0.001$) و کاهش قابل توجه بیان ژن *Bcl-2* حدود ۱۰ برابر ($p < 0.001$) در سلول‌های A431 شد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نویدبخش درمان سرطان پوست است. زیرا، Lacticin 3147 با القای آپوپتوز، جلوگیری از مهاجرت و مهار تهاجم سلول‌های A431، پتانسیل درمان سرطان پوست را در شرایط آزمایشگاهی دارد. همچنین Lacticin 3147 به عنوان یک پری بیوتیک، هیچ سمیتی ندارد و بنابراین ممکن است برای مهار متاستاز سلول‌های سرطانی و تحقیقات بیشتر در داخل بدن نیز مناسب باشد.

بیان بالای ژن‌های پرو آپوپتوتیک *Bax* و آنتی آپوپتوتیک *Bcl-2* به عنوان نشانگرهای زیستی آپوپتوز محسوب می‌شوند (۲۵). در فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی تعادل بین *Bax* و *Bcl-2* حیاتی است و عدم تعادل می‌تواند منجر به آپوپتوز شود (۲۶). مطالعه Chung و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که پری بیوتیک اینولین با تغییر نسبت *Bcl-2/Bax* از طریق مسیر وابسته به کاسپاز، آپوپتوز سلول‌های دندریتیک را القا می‌کند (۲۰). مقالات و تحقیقات پیشین نشان می‌دهند که بیان بالای برخی از ژن‌ها با القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، تکثیر سلول‌های سرطانی را محدود می‌کند (۲۷). مطابق با چنین نتایجی، یافته‌های ما از بررسی ژن‌های آپوپتوز نشان داد که به دنبال تیمار سلول‌ها با Lacticin 3147، بیان بالای ژن *Bax* و تحریک آپوپتوز، تکثیر سلول‌های سرطانی A431 کاهش می‌یابد. همچنین با کاهش بیان ژن *Bcl-2* و

منابع

- Madan V, Lear JT, Szeimies R-M. Non-melanoma skin cancer. The Lancet. 2010;375(9715):673-85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61196-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61196-X).
- Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. Cancer. 2021.
- Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. International journal of dermatology. 2010;49(9):978-86.
- Cotter PD, O'Connor PM, Draper LA, Lawton EM, Deegan LH, Hill C, et al. Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lacticin 3147. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(51):18584-9.
- Negash AW, Tsehai BA. Current applications of Bacteriocin. International Journal of Microbiology. 2020;2020.
- Frias MA, Somers S, Gerber-Wicht C, Opie LH, Lecour S, Lang U. The PGE2-Stat3 interaction in doxorubicin-induced myocardial apoptosis. Cardiovascular research. 2008;80(1):69-77.
- Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, et al. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. Biophysical Journal. 2009;96(4):1388-98.
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 1998;1366(1-2):151-65.
- Golstein P. Controlling cell death. Science. 1997;275(5303):1081-2.
- Freitas JT, Jozic I, Bedogni B. Wound healing assay for melanoma cell migration. Melanoma: Springer; 2021. p. 65-71.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. Cold Spring Harbor Protocols. 2018;2018(6):pdb. prot095497.
- Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, Augoff K. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. Cellular & Molecular Biology Letters. 2020;25(1):1-14.
- Worsley CM, Veale RB, Mayne ES. Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. Plos one. 2022;17(6):e0270599.

14. Li D, Wu L-J, Tashiro S-i, Onodera S, Ikejima T. Oridonin inhibited the tyrosine kinase activity and induced apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(2):254-60.
15. Montaser R, Luesch H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future medicinal chemistry*. 2011;3(12):1475-89.
16. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;112:108612. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>.
17. Ryan A, Patel P, O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Hudson SP. Pharmaceutical design of a delivery system for the bacteriocin lactacin 3147. *Drug Deliv Transl Res*. 2021;11(4):1735-51. 10.1007/s13346-021-00984-9.
18. Ochiwa H, Ailiken G, Yokoyama M, Yamagata K, Nagano H, Yoshimura C, et al. TAS4464, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, activates both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways via c-Myc-mediated regulation in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2021;40(7):1217-30.
19. Zhang X, Bommareddy A, Chen W, Khalifa S, Kaushik RS, Fahmy H, et al. Sarcophine-diol, a Chemopreventive Agent of Skin Cancer, Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis through Extrinsic Pathway in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells. *Transl Oncol*. 2009;2(1):21-30. 10.1593/tlo.08190.
20. Chung J, Yoon Y-O, Lee JS, Ha TK, Ryu SM, Kim KH, et al. Inulin induces dendritic cells apoptosis through the caspase-dependent pathway and mitochondrial dysfunction. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011;34(4):495-500.
21. Juszczak AM, Czarnomysy R, Strawa JW, Zovko Končić M, Bielawski K, Tomczyk M. In vitro anticancer potential of *Jasione montana* and its main components against human amelanotic melanoma cells. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(7):3345.
22. Lin YS, Tsai PH, Kandaswami CC, Cheng CH, Ke FC, Lee PP, et al. Effects of dietary flavonoids, luteolin, and quercetin on the reversal of epithelial-mesenchymal transition in A431 epidermal cancer cells. *Cancer science*. 2011;102(10):1829-39.
23. Muller S, Miglian E, Lecouvey M, Kraemer M, Oudar O. Alendronate inhibits proliferation and invasion of human epidermoid carcinoma cells in vitro. *Anticancer research*. 2005;25(4):2655-60.
24. Sun W, Tao Y, Yu D, Zhao T, Wu L, Yu W, et al. Myricetin exerts potent anticancer effects on human skin tumor cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2018;17(6):1067-72.
25. Napoli S, Scuderi C, Gattuso G, Di Bella V, Candido S, Basile MS, et al. Functional roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in melanoma. *Cells*. 2020;9(5):1151.
26. Bandyopadhyay D, Lopez G, Cantu S, Balboa S, Garcia A, Silva C, et al. Key Enzymes in Cancer: Mechanism of Action and Inhibition With Anticancer Agents. 2018.
27. Webster MR, Fane ME, Alicea GM, Basu S, Kossenkov AV, Marino GE, et al. Paradoxical role for wild-type p53 in driving therapy resistance in melanoma. *Molecular cell*. 2020;77(3):633-44. e5.

Original Article

Investigating the anticancer effect of the lantibiotic, Lacticin 3147

Received: 05/10/2022 - Accepted: 01/12/2022

Mahdiyeh Javaherian¹
Ronak Bakhtiari^{2*}
Hatef Ajoudanifar^{3*}
Amir Mirzaie⁴

¹Ph.D Student of
Microbiology, Department of
Biology, Damghan Branch, Islamic
Azad University, Damghan, Iran

² Associate Professor of Biochemistry
, Department of Pathobiology, School
of Public Health, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

³ Assistant Professor of Mycology,
Department of Biology, Damghan
Branch, Islamic Azad
University, Damghan, Iran.

⁴ Department of Biology, Parand
Branch, Islamic Azad University,
Parand, Iran.

Email:

rounakbakhtiari@yahoo.com
Ajoudanifar@damghaniau.ac.ir

Abstract

Introduction

The most common type of cancer is skin cancer, especially in men. Lacticin 3147 is a bacteriocin from the lantibiotic family. Since it is similar to nisin, Lacticin was considered for its anticancer properties' investigation. The aim was to investigate the effect of Lacticin 3147. The MTT Assay helped assess A431 cell survival and cytotoxicity following treatment with Lacticin 3147 after 24 and 48 hours. The cell apoptosis amounts were investigated by measuring the activity of caspases 8 and 9 in A431 cancer cells treated with the IC50 concentration of Lacticin 3147 after 24, 48, and 72 hours. The Boyden Chamber method evaluated the invasion ability of A431 cancer cells treated with a sublethal dose of Lacticin 3147. Specific primers were designed for proapoptotic genes *bax*, antiapoptotic *bcl-2*, and the reference gene β -*actin*. The expression level in A431 cells treated with IC50 concentration of Lacticin 3147 was investigated using the quantitative Real-Time PCR method. Data were analyzed by SPSS 16 software and ANOVA statistical test ($P < 0.05$).

Statistical analysis of the data obtained from the MTT test showed that the growth of cells treated with different concentrations of Lacticin 3147 decreased significantly ($p < 0.001$). The inhibitory effect of Lacticin 3147 on the viability of A431 cells depends on the concentration and treatment time. As a result, a 0.3 μM concentration and 72-hour duration were the most consequential effects. Lacticin IC50 concentration was equal to 0.8 μM . The activity of caspases 8 and 9 in the treated A431 cancer cells increased in a time-dependent manner, and after 72 hours, it was 2.36 and 2.72 times compared to the control, respectively ($p < 0.001$). The invasion activity of A431 cancer cells treated with the sublethal dose of Lacticin 3147 decreased in a dose-dependent manner. The lowest invasion activity was at concentration of 0.5 μM with minimal lethal effect ($p < 0.001$).

The expression of the *bax* proapoptotic gene in A431 cells treated with IC50 concentration of Lacticin 3147 increased significantly ($p < 0.001$). Also, the antiapoptotic *bcl-2* gene expression reduction was significant in the same conditions. As a result, the use of Lacticin 3147 in the future may lead to a new strategy for the treatment of skin cancer.

Key words

Lacticin 3147, epidermoid carcinoma, antimetastasis, apoptosis

Acknowledgement: There is no conflict of interest