

## **The effect of melittin on the inhibition of Rac1 expression in HeLa cervical cancer cell lines**

**Eivazi-Arvanagh N, Chakerzahi A, Hemati M, Zarinnehad H, Moradi A\***

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I. R. Iran.

Received August 30, 2014; Accepted December 18, 2014

### **Abstract:**

**Background:** Cell migration plays a principal role in many biological and pathological processes, including embryonic and tumor metastasis. It is well-known that Rac1 from Rho GTPase family is the key regulator of the cell migration. Melittin is a natural peptide in bee venom with apoptotic and anti cancer effects. This study aimed to examine the effect of melittin on Rac1 expression.

**Materials and Methods:** HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium until they reached 80% confluency, then treated with melittin (0.5 and 1 µg/ml) with the consideration of IC<sub>50</sub>=1 µg/ml for 6 hours. In the control group the same volume of distilled water, as the melittin solvent, was added. Thereafter, cells were lysed with buffer and after centrifugation the protein concentration of supernatant was measured using the Bradford method. The amount of Rac1 expression was determined using the Western blotting technique and chemiluminescence. Outcomes were normalized with β-Actin as an internal control and the results were displayed as the percentage against the control.

**Results:** The Rac1 expression compared to the control (100%), in the presence of different concentrations of melittin (0.5 and 1 µg/ml) were 13.88%±1.15% and 1.7%±0.96%, respectively which showed a significant reduction in Rac1 melittin expression ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** It can be concluded that melittin can dose-dependently inhibit the Rac1 expression in HeLa cell line.

**Keywords:** Rac1, Cell migration, Melittin, HeLa cells

\* **Corresponding Author.**

**Email:** morady2008@gmail.com

**Tel:** 0098 912 670 6056

**Fax:** 0098 351 820 2633

**Conflict of Interests:** *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2015; Vol. 19, No 1, Pages 60-66*

*Please cite this article as:* Eivazi-Arvanagh N, Chakerzahi A, Hemati M, Zarinnehad H, Moradi A. Effect of melittin on the inhibition of Rac1 expression in HeLa cervical cancer cell lines. *Feyz* 2015; 19(1): 60-6.

# مهار بیان Rac1 توسط ملتین با یک روش وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های HeLa

ندا عیوضی اروانق<sup>۱</sup>، آرزو چاکرزه‌ی<sup>۱</sup>، مهدیه همتی<sup>۲</sup>، حنا زهرین نهاد<sup>۱</sup>، علی مرادی<sup>۳\*</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** مهاجرت سلولی نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک و پاتولوژیک از جمله رشد جنین و متاستاز ایفا می‌کند. یکی از عوامل تنظیم‌کننده مهاجرت سلولی، پروتئین Rac1 از اعضای خانواده Rho GTPase می‌باشد. در این مطالعه از پپتید ملتین موجود در سم زنبور عسل به‌عنوان یک ترکیب طبیعی با اثرات شناخته شده ضد سرطانی و آپوپتوزی بر بیان Rac1 استفاده گردید. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های HeLa در محیط DMEM کشت داده شده و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد به مدت ۶ ساعت با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملتین با احتساب IC50 تیمار شدند. به محیط کشت کنترل به همان میزان آب مقطر استریل به‌عنوان حلال ملتین اضافه گردید. سلول‌ها پس از جمع‌آوری لیز و سانتریفیوژ شده و میزان پروتئین به‌روش بردفورد تعیین غلظت گردید. میزان بیان پروتئین Rac1 در مقایسه با کنترل داخلی ( $\beta$ -Actin) به‌روش وسترن بلات و تشخیص کمی لومینسانس سنجش شد و نسبت به کنترل به‌صورت درصد بیان گردید.

**نتایج:** میزان بیان پروتئین Rac1 نسبت به کنترل (۱۰۰ درصد) در حضور غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملتین به‌ترتیب  $13/88 \pm 1/15$  و  $1/7 \pm 0/96$  درصد به‌دست آمد که نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در بیان این پروتئین می‌باشد ( $P < 0/05$ ). **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت تاثیر ملتین بر مهار بیان Rac1 در سلول‌های سرطانی گردن رحم HeLa وابسته به دوز می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** Rac1، مهاجرت سلولی، ملتین، HeLa Cells

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴، صفحات ۶۶-۶۰

## مقدمه

یکی از عوامل تنظیم‌کننده مهاجرت سلولی، اعضای خانواده Rho GTPase می‌باشند. Rac1 به‌عنوان عضوی از این خانواده نقش مهمی در مهاجرت سلولی ایفا می‌کند. این G پروتئین در سلول‌های HeLa باعث تشکیل برآمدگی‌های وسیع غشایی در پاسخ به فیبرونکتین شده که در نهایت منجر به الفاء متاستاز در این سلول‌ها می‌گردد [۷-۱۰]. هم‌چنین، Rac1 یکی از اجزای اصلی فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز است که این آنزیم خود به‌عنوان منبع اصلی تولید آنیون‌های سوپراکسید و مشتقات پراکسیدانی می‌باشد. افزایش فعالیت NADPH اکسیداز و تولید ROS بعد از فعال شدن Rac1 در بافت‌های سرطانی و فیبروز دیده شده است. بنابراین، این ترکیباتی که بتوانند باعث کاهش بیان پروتئین Rac1 شوند، می‌توانند با کاهش رادیکال‌های آزاد تا میزان قابل ملاحظه‌ای جلوی سرطانی شدن، متاستاز دادن و فیبروز شدن سلول‌ها را بگیرند [۱۱]. امروزه مطالعات زیادی برای کاهش دادن و یا خاموش کردن بیان این ژن با استفاده از RNAهای کوچک و هم-چنین ترکیبات طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان و یا آپوپتوزی می‌باشند در درمان سرطان پروستات، تیروئید و سینه انجام شده است [۱۱، ۹، ۶]. نشان داده شده است که Rac1 در هسته سلول‌های اپی‌تلایل رده سلولی گردن رحم بیان می‌شود و مهار شیمیایی آن، تکثیر این سلول‌ها را کاهش می‌دهد [۱۱-۱۳، ۸]. مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که کاهش بیان

سرطان گردن رحم دومین سرطان شایع در زنان در سراسر جهان می‌باشد که سالانه ۵۵۰۰۰ مورد جدید به آن مبتلا شده و ۳۱۰۰۰۰ نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند [۱]. یک‌سوم بیماران جان خود را بر اثر اشکال عود کننده، متاستاتیک و مقاوم به داروی این بیماری از دست می‌دهند [۲]. فعال‌ترین دارو برای مقابله با این بیماری سیس پلاتین می‌باشد که میزان پاسخ‌دهی آن در بیماران مبتلا به اشکال متاستاتیک و عود کننده تنها در حدود ۴۰ درصد می‌باشد [۳]. مهاجرت سلولی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک و پاتولوژیک شامل ترمیم زخم، عقب‌ماندگی ذهنی، متاستاز تومور، ایجاد آترواسکلروز و آرتریت نقش ایفا می‌کند [۴-۶].

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

<sup>۲</sup> دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

<sup>۳</sup> استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

## \* نشانی نویسنده مسئول:

یزد، خیابان شهدای گمنام، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن: ۰۵۶۰۶۷۰۶۰۹۱۲

دورنویس: ۰۳۵۱ ۸۲۰۲۶۳۳

پست الکترونیک: morady2008@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۸

### مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تجربی ملیتین از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و استوک زهر زنبور با غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با آب مقطر استریل تهیه گردید.

#### کشت سلولی

رده سلولی سرطان دهانه رحم HeLa از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در فلاسک  $250\text{cm}^2$  حاوی محیط کشت (DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium) غنی شده با ۱۵ درصد FBS (Fetal Bovin Serum/Gibco-) (BRL)، حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتو-مایسین (sigma/آمریکا)، شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شد. بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به بیش از ۸۰ درصد با توجه به  $IC_{50}$  ملیتین که برای مدت زمان ۱۲ ساعت  $1\ \mu\text{g/ml}$  می‌باشد [۲۱،۲۰]، غلظت‌های برابر و پایین‌تر از  $IC_{50}$ ، ۱/۵ و ۱ میکروگرم انتخاب شده و سلول‌های HeLa به مدت ۶ ساعت تحت تاثیر این غلظت‌ها تیمار شدند. چون حلال ملیتین آب استریل بود در گروه کنترل به جای ملیتین، آب استریل هم حجم به محیط کشت اضافه شد. برای جداسازی، شستشو با بافر فسفات سرد دو مرتبه انجام شد و سپس با استفاده از اسکرابر، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. به‌منظور لیز کردن، سلول‌ها در بافر HES (۲۲۵ میلی‌مول سوکروز، ۴ میلی‌مول Na<sub>2</sub>EDTA، ۲۰ میلی‌مول HEPES، ۰/۸ میلی‌مول PMSF و ۱ درصد کوکتل آنتی‌پروتئاز) به‌خوبی مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و سپس ورتکس شدند. برای جداسازی بقایای سلول‌های تخریب شده، سلول‌های لیز شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی به‌منظور انجام آزمون‌های ایمونوبلاتینگ جدا شده و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن مقدار پروتئین به روش بردفورد تعیین غلظت شد.

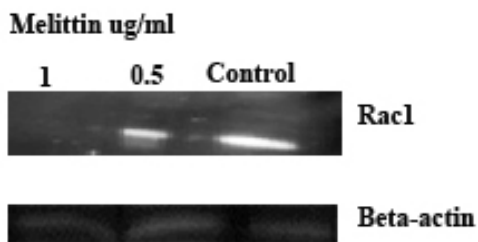
#### الکتروفورز و ایمونوبلاتینگ

مقدار ۱۰۰ میکروگرم از نمونه‌ها روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد (SDS-PAGE) بارگذاری شد و با ولتاژ ثابت ۸۰ میلی‌ولت عمل جداسازی انجام گردید. سپس، باندهای مربوطه از ژل به کاغذ نیتروسولوز انتقال داده شدند. بعد از انتقال، غشای نیتروسولوز با محلول ۵ درصد شیر بدون چربی به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس از شستشوی کامل با بافر شستشو (Tris TBS/T Buffer Salin- 0.1%Twin20)، غشا با آنتی‌بادی‌های اولیه

Rac1 در شرایط درون‌تنی باعث افزایش حساسیت سلول‌های HeLa به سیس پلاتین می‌شود [۱۲]. هم‌چنین مشخص شده است که مهار بیان Rac1 توسط Rac1 shRNA منجر به کاهش تکثیر سلول‌های HeLa و توانایی تهاجم این سلول‌ها می‌شود [۱۲]. سم زنبور حاوی پپتیدهای فعال بیولوژیک متعددی شامل ملیتین (ترکیب اصلی موجود در سم زنبور)، آپامین، آدولاپین، پپتید دگرانوله‌کننده ماست‌سل‌ها و آنزیم‌های فسفولیپاز A<sub>2</sub> و هیالورونیداز و هم‌چنین ترکیبات غیرپپتیدی همانند هیستامین، دوپامین و نوراپی‌نفرین می‌باشد [۱۴]. در طول دو دهه اخیر توجه زیادی به سم زنبور و پپتیدهای تشکیل‌دهنده آن به‌خصوص ملیتین با خواص آپوپتوزی و ضد سرطانی آن شده است [۱۵]. سم زنبور می‌تواند باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی گردن رحم شود. القاء آپوپتوز در این سلول‌ها از طریق گیرنده Fas و هم‌چنین از طریق مسیر میتوکندریایی می‌باشد [۱۵]. هم‌چنین، نشان داده شده است که ملیتین باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تخمدان رده سلولی SKOV3 و PA-1 از طریق افزایش بیان گیرنده‌های مرگ DR3، DR4 و DR6 و مهار مسیر STAT3 می‌شود [۱۶]. ملیتین می‌تواند باعث توقف چرخه سلولی و مهار رشد گردد [۱۷-۱۵]. ملیتین آنزیم‌های مختلف از جمله G-پروتئین‌ها، پروتئین کیناز C، آدنیلات سیکلاز، و فسفولیپاز D را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هم‌چنین، دارای نقش انتقال پیام داخل سلولی می‌باشد. این پپتید به‌طور مستقیم جابجایی نوکلئوتید به‌وسیله پروتئین‌های هتروتیریمی متصل به GTP را تحریک می‌کند. علاوه بر این، باعث مهار فعالیت G<sub>s</sub> به‌وسیله کاهش تمایل GTP و GDP به G<sub>s</sub> می‌شود [۱۸]. Liu و همکارانش نشان داده‌اند که ملیتین باعث جلوگیری از متاستاز در سلول‌های سرطانی کبد، رده HCC، از طریق مهار بیان Rac1 در هر دو محیط برون و درون-تنی می‌شود [۱۶]. هم‌چنین، نشان داده شده است که چای سبز با کاهش بیان Rac1 می‌تواند در کاهش مهاجرت و خاصیت تهاجمی سلول‌های سرطان سینه رده MCF-7 نقش مهمی داشته باشد [۱۷]. ما نیز به این نتیجه رسیدیم که ملیتین در غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۱۲ ساعت باعث مهار بیان Rac1 در سلول‌های HeLa می‌شود [۱۸]. اما به‌منظور کاهش عوارض جانبی ملیتین [۱۹] بر آن شدید تا به بررسی اثر ملیتین در غلظت‌های مشابه به مدت ۶ ساعت پیردازیم و غلظت مناسب ملیتین که در کوتاه‌ترین زمان ممکن اثر بخشی قابل قبول در مهار بیان این پروتئین دارد را به‌دست آوریم.

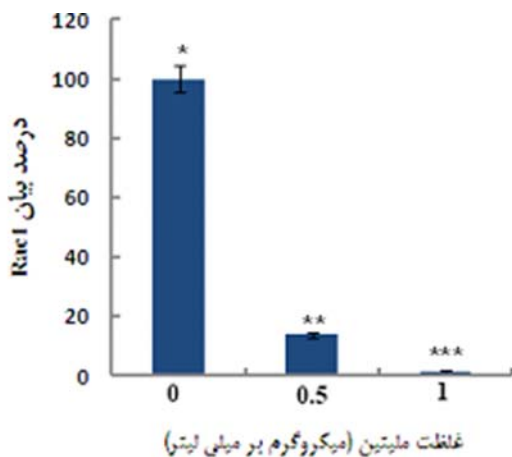
مهار بیان Rac1 توسط ملتین با یک روش، ...

بررسی بیان پروتئین Rac1 به روش وسترن بلات یافته‌های به دست آمده از تاثیر ملتین بر میزان بیان پروتئین Rac1 نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی HeLa با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملتین به مدت ۶ ساعت در مقایسه با کنترل تاثیر قابل توجهی بر روی میزان بیان پروتئین Rac1 داشت؛ به طوری که در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان Rac1 کاهش معنی‌دار و چشم‌گیری نشان داد ( $P < 0/5$ ). به علاوه، نتایج نشان می‌دهد که تاثیر ملتین بر بیان Rac1 وابسته به دوز می‌باشد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- باندهای وسترن بلا تی‌نگ Rac1 در غلظت‌های مختلف ملتین (میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با کنترل بتا اکتین.

برای مقایسه راحت‌تر باندهای حاصل از وسترن بلات، با استفاده از نرم‌افزار Gene tools آنالیز انجام شد و به صورت درصدی ارائه گردید (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف ملتین (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر کاهش بیان پروتئین Rac1 بر حسب درصد (نسبت به کنترل نرمال سازی انجام شده است). \* غلظت صفر یا کنترل (۱۰۰ درصد)، \*\* غلظت ۰/۵ (۱۳/۸ درصد)، \*\*\* غلظت ۱ (۱/۷ درصد).

### بحث

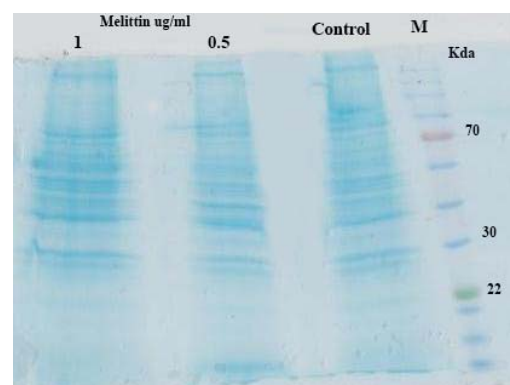
باتوجه به اثرات جانبی روش‌های شیمیایی درمان سرطان، نظر محققان به استفاده از ترکیبات طبیعی که خواص ضد سرطانی

علیه  $\beta$ -Actin (cell signaling) با غلظت ۱:۱۰۰۰ و Rac1 (Santa Cruz Biotechnology/آمریکا) با غلظت ۱:۵۰۰۰ رقیق شده در محلول ۵ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو، غشا به مدت دو ساعت در دمای محیط با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با Horseradish Peroxidase (HRP) با غلظت ۱:۲۰۰۰ در محلول TBS/T انکوبه گردید. پس از شستشو، باندها به روش کمی لومینسانس تقویت شده با استفاده از کیت ECL (GE/Amersham Healthcare انگلستان) و دستگاه Gel Documentation (SYNGENE، انگلستان) عکس‌برداری شدند. شدت باندهای به دست آمده با نرم افزار Gene tools آنالیز شده و به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند. نتایج به دست آمده از تکرار سه بار آزمایش می‌باشد. برای بررسی و مقایسه، میانگین شدت باندهای پروتئین Rac1 با میانگین شدت باند کنترل داخلی  $\beta$ -Actin نرمال سازی انجام شد.

### نتایج

#### الکتروفورز

بعد از لیز کردن سلول‌های تیمار شده با ملتین و تعیین غلظت به روش بردفورد، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از نمونه‌های لیز شده روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد برده شد. برای اطمینان از لیز شدن نمونه‌ها و بررسی باندها بعد از الکتروفورز، ژل مورد نظر به روش کماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و سپس با محلول رنگ‌بر، رنگ‌بری انجام گردید (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- بررسی الگوی الکتروفورزی نمونه لیز شده سلول‌های HeLa تیمار شده با غلظت‌های ملتین نسبت به کنترل با استفاده از ژل الکتروفورز ۱۰ درصد (SDS-PAGE). M: مارکر، ۰/۵ و ۱ (تیمار سلول‌های HeLa با غلظت‌های ملتین بر حسب  $\mu\text{g/ml}$ ).

و ضد متاستازی دارند، جلب شده است. در این مطالعه به بررسی اثر ملتین به عنوان یک ترکیب طبیعی مشتق شده از سم زنبور عسل بر میزان بیان پروتئین Rac1 پرداخته شده است. ملتین از پپتید-هایی است که اثرات آپوپتوزی و ضد سرطانی آن به اثبات رسیده است [۲۰-۱۵]؛ بنابراین در این تحقیق بر آن شدیم تا تاثیر این پپتید بر روی Rac1 یکی از پروتئین‌های مهم در متاستاز در سلول‌های سرطانی رحم، که در ایران سالیانه باعث مرگ و میر تعدادی از افراد می‌شود را بررسی کنیم. از آنجایی که بیان Rac1 در سلول‌های سرطانی افزایش پیدا می‌کند و در تغییر شکل سلول با تاثیر بر روی فیلامنت‌های اکتین و در نتیجه مهاجرت سلول موثر است و همچنین ارتباط تنگاتنگی که با آنزیم NADPH اکسیداز در تولید رادیکال‌های آزاد دارد، تحقیقات زیادی با استفاده از میکرو RNAها برای خاموش کردن بیان این پروتئین شده است و نتایج بسیار خوبی در کاهش متاستاز در سرطان‌های پروستات، تیروئید و... به دست آمده است [۱۱-۲۲،۹]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده اثر مهارتی قابل توجه ملتین در یک روش وابسته به غلظت بر میزان بیان پروتئین Rac1 می‌باشد. بیشترین اثر مهارتی مربوط به غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملتین می‌باشد که نسبت به کنترل توانست بیان را به میزان ۱/۷ درصد کاهش دهد. این مطلب نشان‌دهنده این است که ملتین در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۶ ساعت اثر مهارکنندگی تقریباً مشابهی با غلظت یکسان در مدت ۱۲ ساعت (۲۴٪ درصد) دارد [۱۸]. برای تصدیق آزمایش وسترن می‌توان به ژل الکتروفورز ارجاع داد. در الکتروفورز نمونه‌های لیز سلولی از کنترل و تیمار با ۱/۵ و ۱ میکروگرم ملتین نشان‌دهنده این است که پروتئین‌ها به یک نسبت بر روی ژل برده شده و بنابراین مشکلی در بیان و میزان پروتئین وجود ندارد. مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های سرطانی کبد، رده HCC و اثر ملتین بر متاستاز این سلول‌ها صورت گرفته است، نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که ملتین باعث کاهش متاستاز این سلول‌ها از طریق مهار بیان Rac1 در هر دو محیط برون و درون-تنی می‌شود. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر مهار بیان Rac1 توسط ملتین، علی‌رغم تفاوت در رده سلولی، همگام و موافق می‌باشد و با توجه به اهمیت Rac1 در پیشرفت سرطان و متاستاز، نتایج این دو تحقیق در کنار هم می‌تواند اهمیت استفاده از ملتین را در کنار سایر داروها به منظور بهبود سیر درمانی بیماری سرطان روشن سازد [۱۶]. نتایج یک تحقیق دیگر که در آن اثر چای سبز بر روی مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی سینه رده MCF-7 بررسی شده است نشان

می‌دهد که چای سبز تاثیر به‌سزایی در کاهش بیان Rac1 دارد. در این تحقیق به این نکته اشاره شده است که مردم آسیای شرقی به احتمال زیاد به خاطر نوشیدن چای سبز کمتر دچار سرطان می‌شوند [۲۳]. نظر به اینکه Rac1 در هسته سلول‌های سرطانی گردن رحم بیان می‌شود و مهار شیمیایی آن تکثیر این سلول‌ها را کاهش می‌دهد و با توجه به اینکه نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده مهار بیان Rac1 در این سلول‌ها توسط ملتین می‌باشد، می‌توان از اثرات پیشگیری‌کننده از سرطان این ترکیب طبیعی در سرطان دهانه رحم بهره برد [۱۲]. شواهد رو به رشدی وجود دارد که نشان‌دهنده دخالت خانواده Rho-GTPase در مراحل مختلف ایجاد و پیشرفت سرطان شامل ترانسفورماسیون سلولی، بقاء، تهاجم، متاستاز و آنژیوژنز می‌باشد [۲۷-۲۴]. افزایش بیان RhoA، Rac1 و Cdc42 با سرطان‌زایی و پیشرفت تومورهای متعدد انسانی مرتبط است [۲۴]. مشخص شده است که بیان RhoA، ROCK و Rac1 در بافت توموری بیضه بیشتر از بیان آن در بافت طبیعی بیضه می‌باشد. این شواهد نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد که احتمالاً خانواده Rho GTPase در سرطان‌زایی و مهاجرت سلول‌های توموری بیضه، رده GCT، نقش قابل توجهی ایفا می‌کند [۲۸]. افزایش تعداد چسبندگی‌های موضعی در سلول با افزایش تهاجم آن مرتبط است. فعال شدن Rac منجر به پلیمر-یزاسیون اکتین و تشکیل Lamellipodia می‌شود که این امر خود منجر به افزایش چسبندگی‌های موضعی می‌شود. تشکیل چسبندگی‌های موضعی نیز به نوبه خود باعث فعال شدن Rac می‌شود که یک حلقه پس‌نورد مثبت را ایجاد می‌کند؛ هنگامی که این حلقه از تنظیم خارج شود، تحرک و تهاجم سلول افزایش می‌یابد. این نظریه بیان‌کننده این مطلب است که افزایش فعالیت Rac1 در واریانت‌های متاستاتیک سلولی افزایش می‌یابد [۲۹].

#### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیان‌گر اثر مهارتی ملتین بر میزان بیان Rac1 با یک روش وابسته به دوز در سلول‌های سرطانی گردن رحم می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر در کنار نتایج مطالعه پیشین [۱۸] بیان می‌کند که غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ملتین در مدت زمان ۶ ساعت به عنوان غلظت و زمان مناسب قادر به مهار بیان Rac1 در سلول‌های HeLa می‌شود و می‌توان از این شرایط به منظور مهار موثر Rac1 در سلول‌های HeLa در مطالعات آتی استفاده نمود. در صورت تایید این نتایج توسط مطالعات جانوری و انسانی می‌توان از پتانسیل درمانی این ماده بهره برد.

یزد که ما را در انجام این کار یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. از تمام همکاران گروه بیوشیمی دانشگاه شهید صدوقی

## References:

[1] Boyle P, Levin B. World cancer report: IARC Press, International Agency for Research on Cancer; 2008.

[2] Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):100-10.

[3] Legge F, Fuoco G, Lorusso D, Lucidi A, Borriello M, Pisconti S, et al. Pharmacotherapy of cervical cancer. Expert opinion on pharmacotherapy. 2010;11(12):2059-75.

[4] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302(5651): 1704-9.

[5] Zhang H, An F, Tang L, Qiu R. Multiple Effects of a Novel Epothilone Analog on Cellular Processes and Signaling Pathways Regulated by Rac1 GTPase in the Human Breast Cancer Cells. *Korean j physiol pharmacol* 2014; 18 (2): 109-20.

[6] Zhao H, Dong T, Zhou H, Wang L, Huang A, Feng B, et al. miR-320a suppresses colorectal cancer progression by targeting Rac1. *Carcinogenesis* 2014; 35(4): 886-95.

[7] Katoh H, Hiramoto K, Negishi M. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 1): 56-65.

[8] Mendoza-Catalán MA, Cristóbal-Mondragón GR, Adame-Gómez J, del Valle-Flores HN, Coppe JF, Sierra-López L, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells. *BMC Cancer* 2012; 12: 116.

[9] Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, Huang J, Jiang B, et al. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate* 2014; 74(16): 1613-21.

[10] Wang C, Lu S, Jiang J, Jia X, Dong X, Bu P. Hsa-microRNA-101 suppresses migration and invasion by targeting Rac1 in thyroid cancer cells. *Oncol lett* 2014; 8(4): 1815-21.

[11] Wang J, Dai JM, Che YL, Gao YM, Peng HJ, Liu B, et al. Elmo1 helps dock180 to regulate Rac1 activity and cell migration of ovarian cancer. International journal of gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24(5): 844-50.

[12] Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. Rac1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J* 2000; 14(12): 1705-14.

[13] Xu AL, Yu GQ, Kong XC, Qiu XH, Li PL. Effect of Rac1 downregulation mediated by shRNA

on the biological behaviour of human cervical cancer cells. *J Int Med Res* 2013; 41(4): 1037-48.

[14] Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972; 177(4046): 314-22.

[15] Ling CQ, Li B, Zhang C, Gu W, Li SX, Huang XQ, et al. [Anti-hepatocarcinoma effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12(12): 741-4.

[16] Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology* 2008; 47(6): 1964-73.

[17] Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258(1): 72-81.

[18] Hemati M, Eivazi N, Chakerzahi A, Moradi A, Mohiti Ardakani J, Mahmoodzade A. The effect of melittin on rac1 protein expression as a metastatic factor in AGS gastric cancer cell lines. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2014; 22(2): 1001-9.[in Persian]

[19] Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. Environmental toxicology and pharmacology. 2013;36(2):697-705.

[20] Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(1-2): 173-94.

[21] Zarinnahad H, Mahmoodzadeh A, Pooshang Bagheri K, Mahdavi M, Shahbazzadeh D, Moradi A. Isolation of Melittin from Iranian Honey Bee Venom and Investigation of Its Effect on Proliferation of Cervical Cancer-HeLa Cell Line. *SSU\_J* 2013; 21(2): 226-38.

[22] Wang P, Chen L, Zhang J, Chen H, Fan J, Wang K, et al. Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 2014; 33(4): 514-24.

[23] Zhang Y, Han G, Fan B, Zhou Y, Zhou X, Wei L, et al. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate down-regulates VASP expression and inhibits breast cancer cell migration and invasion by attenuating Rac1 activity. *Eur J Pharmacol* 2009; 606(1-3): 172-9.

[24] Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(2): 133-42.

[25] Lewis-Saravalli S, Campbell S, Claing A. ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal* 2013; 25(9): 1813-9.

[26] Ma J, Xue Y, Liu W, Yue C, Bi F, Xu J, et al. Role of activated Rac1/Cdc42 in mediating endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis in breast cancer. *PloS One* 2013; 8(6): e66275.

[27] Cardama GA, Comin MJ, Hornos L, Gonzalez N, Defelipe L, Turjanski AG, et al. Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(6): 840-51.

[28] Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14): 4799-805.

[29] Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7(6): R965-74.