

## بهبود اثر ضد توموری پکلی تاکسل توسط پپتید ضد رگ زایی در مدل موشی

مهسا قیاسیان ایبانه<sup>۱</sup>، سمیه احتشام<sup>۱</sup> و سرور رمضانپور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

<sup>۲</sup> گروه شیمی، دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

### خلاصه

عوامل ضد رگ زایی اثر داروهای سیتوتوکسیک را بهبود می‌بخشند. در این مطالعه، اثر و مکانیسم عمل ضد سرطانی یک پپتید ضد رگ زایی، که به طور اختصاصی به گیرنده های VEGFR1 و VEGFR2 متصل شده و مسیر پیام رسانی آنها را سرکوب می‌نماید، به صورت درمان ترکیبی با داروی پکلی تاکسل بررسی می‌شود. مدل توموری مورد استفاده کارسینومای پستان القا شده توسط سلولی موشی 4T1 بوده است. موش های توموری از روز چهاردهم تا سی ام پس از ایمپلنت تومور با پکلی تاکسل، پکلی تاکسل بعلاوه پپتید (بنام VGB3) و PBS بعنوان گروه کنترل به صورت درون وریدی تیمار شدند (n=6). در نتیجه تیمارها پکلی تاکسل به طور موثری رشد تومورها را مهار نمود و میزان مهار در تیمار ترکیبی با پکلی تاکسل بعلاوه پپتید بهبود یافت. بررسی مکانیسم اثر بخشی تیمارها با روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی بادی های علیه Ki67 (مارکر تکثیر سلول های تومور)، Cyclin D1 و CDK4 (مارکرها های چرخه سلولی)، P53 و Bcl2 (مارکرها های آپوپتوز) و E-Cadherin و Vimentin (مارکرها های متاستاز) نشان داد که در بافت تومور درمان ترکیبی به طور موثرتری تکثیر سلولهای تومور و چرخه سلولی را مهار نمود، القای آپوپتوز را موجب شد و میزان تمایل به متاستاز را کاهش داد. بنابراین نتایج، درمان ترکیبی داروی سیتوتوکسیک پکلی تاکسل همراه با پپتید ضد رگ زایی از درمان تنها با داروی شیمی درمانی موثرتر است و تاثیرگذاری بیشتر مربوط به مهار چرخه سلولی و تکثیر، القای آپوپتوز و مهار متاستاز موجب تقویت اثربخشی دارو در تومور است.

**واژه های کلیدی:** سرطان پستان، پپتید ضد رگ زایی، پکلی تاکسل، چرخه سلولی، آپوپتوز

### مقدمه

سرطان همچنان تهدیدی قابل توجه برای سلامت انسان در سراسر جهان است. برای چندین دهه، شیمی درمانی یکی از رایج ترین و موثرترین استراتژی ها برای درمان سرطان باقی مانده است. پاسخ های کاهش دهنده اثرات دارو و عوارض جانبی نامطلوب، محدودیت های شایع درمان های شیمی درمانی هستند. پکلی تاکسل یک عامل تثبیت کننده میکروتوبول است که برای درمان سرطان تخمدان، پستان، ریه و موارد دیگری تایید شده است (۸). این دارو مدت طولانی است که به عنوان یک داروی شیمی درمانی خط اول برای چندین نوع سرطان استفاده می شود. با این حال، تعداد زیادی از مطالعات مقاومت دارویی اکتسابی و همچنین عوارض جانبی نامطلوب را گزارش کرده اند که به طور قابل توجهی استفاده بالینی پکلی تاکسل را محدود می کند (۵).

رگ زایی یک فرآیند بسیار تنظیم شده است که به موجب آن رگ های خونی جدید از رگ های از قبل موجود تشکیل می شوند (۱). رگ زایی پاتوفیزیولوژیک یکی از مشخصه های بیماری سرطان است، که در آن تعداد سلول های اندوتلیال در حال تکثیر به طور قابل توجهی افزایش می یابد و مورفولوژی عروق به طرق مختلف تغییر می کند (۶). تقویت اثربخشی

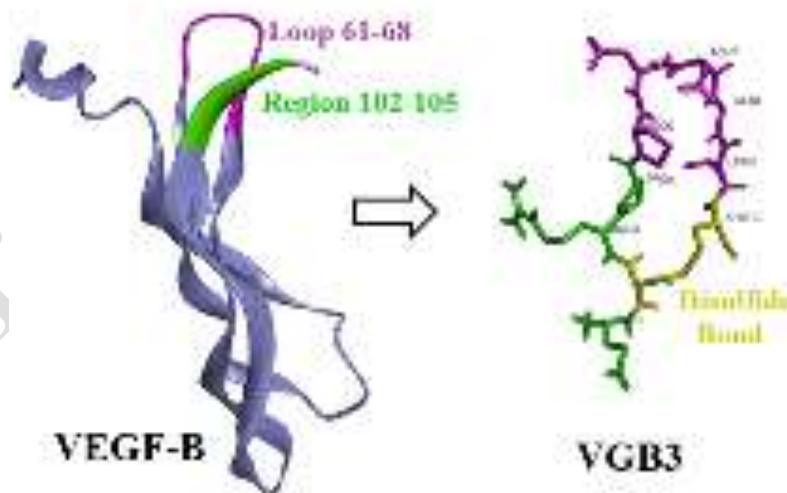
درمان‌های ضد سرطان سیتوتوکسیک با تجویز عوامل ضد رگ‌زایی در چندین سیستم تجربی *in vivo* نشان داده شده است (۱۰). اثربخش‌ترین عوامل ضد رگ‌زایی مواردی هستند که مسیر پیام‌رسانی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی موسوم به VEGF را مسدود می‌سازند (۱۶). بر این اساس اخیراً یک پپتید ضد رگ‌زایی به نام VGB3 گزارش شده که قادر است هم‌زمان به گیرنده‌های VEGFR1 و VEGFR2 اتصال یافته و مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست هر دو گیرنده را سرکوب نماید (۱۳-۱۲، ۳).

درمان ترکیبی داروهای سیتوتوکسیک و ضد رگ‌زایی موجب بهبود اثر بخشی دارو و مهار موثرتر رشد تومور خواهد شد. از این رو، در این مطالعه، تیمار ترکیبی پکلی تاکسل با پپتید ضد رگ‌زایی VGB3 در شرایط *in vivo* برای اثرات ضد توموری مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، ما به دنبال تشریح مکانیسم‌های مولکولی که اثرات ضد توموری این درمان ترکیبی را موجب می‌شوند، بوده ایم. نتایج ما نشان می‌دهد که VGB3 اثر ضد توموری پکلی تاکسل را با مهار تکثیر سلولی، چرخه سلولی و القای آپوپتوز در مدل‌های موش زئوگرافت ماماری کارسینوما 4T1 بهبود می‌دهد.

## مواد و روش‌ها

### طراحی پپتید ضد رگ‌زایی

پپتیدومیمتیک مورد استفاده در تحقیق حاضر بر اساس یک ناحیه اتصال فاکتور رشد VEGFB به گیرنده‌های VEGFR1 و VEGFR2 طراحی شده است. این پپتید مشتمل بر باقیمانده‌های لوپ  $^{68}\text{Pro-Asp-Asp-Gly-Leu-Glu-Cyc}$  و قطعه  $^{102}\text{Glu-Cyc-Arg-Pro}$  بوده و ترادف آن  $^{105}\text{HN-Glu-Cys-Arg-Pro-Pro-Asp-Asp-Gly-Leu-Cys-}$  است (۳). جهت حفظ ساختمان لوپ یک پیوند دی‌سولفیدی بین باقیمانده‌های سیستئین برقرار شده است. براساس جزئیات اشاره شده در مطالعه اخیر، پپتید به روش فاز جامد سنتز شده، و خلوص آن توسط HPLC و ساختمان شیمیایی آن توسط روش طیف‌سنجی جرمی تایید شده است (۱۳).



شکل ۱- نمایش گرافیکی VEGF-B (سمت چپ) و ساختمان پپتیدومیمتیک VGB3 (سمت راست). ساختمان VEGF-B (کد PDB: 2C7W) به رنگ خاکستری و ناحیه‌ای از ساختمان آن که در طراحی پپتید VGB3 مورد نظر قرار گرفته به رنگ‌های سبز و بنفش نمایش داده شده است. در ساختمان پپتیدومیمتیک پیوند دی‌سولفیدی با رنگ زرد مشخص است. ساختمان مدل پپتید با استفاده از نرم‌افزار MODELLER version 9.18 بدست آمده است.

## کاشت تومور و بررسی اثر پپتید VGB3 بر رشد تومور کارسینومای پستان 4T1 در مدل موشی

اثرات ضد توموری پپتید VGB3 در تومور کارسینومای پستان 4T1 در مدل موشی بررسی شد. موش‌های ماده نژاد بالب سی (Balb/C) از بخش مطالعات حیوانی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران با محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۰ گرم و محدوده سنی ۷-۵ هفته‌ای استفاده شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد؛ در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۰ درصد با فاز ۱۲ ساعته تاریکی-نور، با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. همه مراحل کار منطبق بر دستورالعمل‌های کمیته نگهداری استفاده از حیوانات (IACUC) دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده است. جهت ایجاد تومور در موش‌ها، ابتدا در پهلوئی سمت راست یک موش به صورت زیر پوستی به مقدار  $10^6$  سلول (۵۰۰ میکرولیتر) سلول رده ی 4T1 تزریق شد. پس از گذشت ۱۴ روز از تزریق و رشد تومور با استفاده از روش استنشاق  $CO_2$  به حیات حیوان به صورت بدون درد خاتمه داده شد. تومور با استفاده از قیچی جراحی و اسکالپل استریل، از حیوان جدا شده و به یک ظرف استریل حاوی مقدار کافی بافر نمکی منتقل گردید. قسمت‌های نکرور شده مرکز تومور جدا و تومور به قطعات کوچک و هم‌اندازه (حدود  $0.3 \text{ cm}^3$ ) برش داده شد. موش‌های توموری با تزریق صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. هنگامی که اندازه تومورها به اندازه تقریبی ۲۰۰ میلی‌متر مکعب رسید، حیوان‌ها به گروه‌های ۵ سری تقسیم شدند. به گروه‌های تیمار دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش از پپتید به صورت یک روز در میان و یکلی تا کسل به صورت چهار روز در میان و گروه کنترل حجم مساوی از PBS دریافت کردند و دوره تزریق به مدت دو هفته ادامه یافت. تزریق‌ها به صورت تزریق از رگ انجام گردید. حجم تومور هر پنج روز با یک کولیس ورنیر دیجیتالی با استفاده از این فرمول محاسبه شد:  $v = a^2 \times b \times 0.52$  (که  $a$  کوتاهترین و  $b$  طویل‌ترین قطر می‌باشد). این پژوهش با رعایت ملاحظات اخلاقی و بر اساس مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند به انجام رسیده است (IR.IAU.VARAMIN.REC.1400.030).

### مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی

ابتدا بافت‌های توموری که در پایان مطالعه (روز ۳۰ پس از ایمپلنت کردن) از موش‌ها برداشته شده بود، در فرمالین فیکس گردید و سپس بلوک‌های پارافینی از آنها تهیه شد. برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به روش ایمونوپراکسیداز استرپتو آویدین بیوتین استفاده شد (۴). ابتدا برش‌های پارافینی با ضخامت ۵ میکرون روی اسلاید قرار گرفته و سپس پارافین زدایی شدند. پس از تیمار در پراکسید هیدروژن ۳٪ در متانول، نمونه‌ها ۱۵ دقیقه تحت تاثیر امواج ماکروویو قرار گرفت. سپس برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی از آنتی بادی مورد نظر (۱/۲۰۰۰ v/۷) استفاده و سپس و از آمینوبنزیدین به عنوان کروموژن استفاده شد.

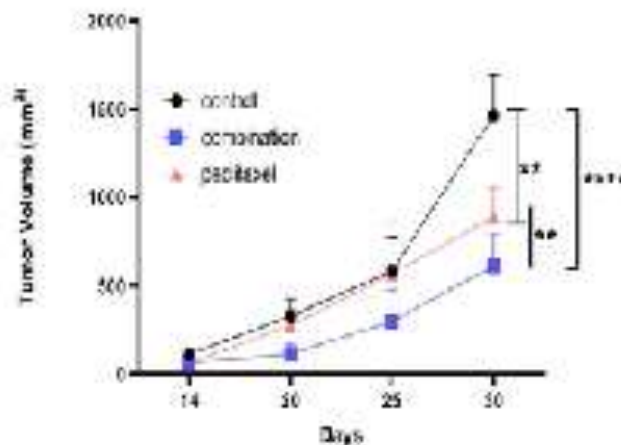
### آنالیز آماری

نرم‌افزار Prism (نسخه‌ی ۶ برای ویندوز، نرم‌افزار GraphPad، La Jolla؛ [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، تولید نمودارها و تحلیل آماری استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین خطای استاندارد ( $\pm$  SEM) ارائه شده است. آنالیز ANOVA یک‌طرفه پشتیبانی‌شده توسط آزمون Tukey's post-hoc برای تعیین معنی‌دار بودن آماری برای مقایسه‌ی چندگانه استفاده شد. هم‌چنین اندازه‌گیری‌های مکرر ANOVA دو طرفه پشتیبانی‌شده توسط آزمون Tukey's post-hoc، در مطالعه‌ی اثربخشی تیمارها بر مهار رشد تومور مورد استفاده قرار گرفت.  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

## بررسی اثر درمان ترکیبی بر مهار رشد تومور پستان موشی

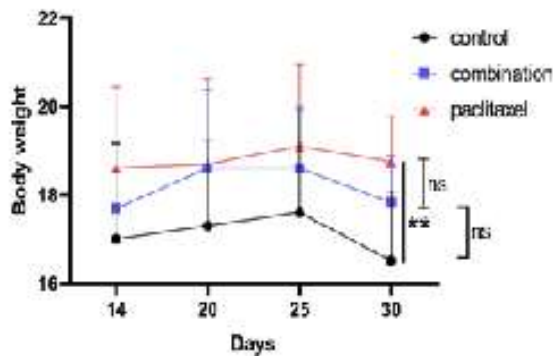
تمرکز تحقیق حاضر بر این است که آیا درمان ترکیبی با پپتید ضد رگ زایی VGB3 و داروی شیمی‌درمانی پکلی تاکسل می‌تواند منجر به مهار موثرتر رشد تومور پستان شود. بدین منظور، اثر پپتید و داروی پکلی تاکسل بر رشد تومور موشی پستان رده سلولی 4T1 در موش‌های ماده نژاد بلب سی مورد بررسی قرار گرفت. موش‌ها به صورت به صورت یک روز در میان با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم از VGB3 و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم از پکلی تاکسل به مدت ۲ هفته تحت تیمار قرار گرفتند (در هر گروه،  $n = 5$  می‌باشد، تزریق به صورت درون‌وریدی (i.v.) انجام شد). در روز ۳۰ پس از ایمپلنت میانگین حجم تومور در گروه‌های کنترل، پکلی تاکسل و درمان ترکیبی به ترتیب ۷۰۹/۷ و ۴۱۰/۱ میلی متر مکعب بود، که نشان‌دهنده‌ی سرکوب قابل توجه رشد تومور در مقایسه با گروه کنترل تحت تیمار با PBS (۱۲۱۵/۸ میلی متر مکعب) می‌باشد (شکل ۲). بر این اساس، مهار رشد تومور به ترتیب ۴۱/۶ و ۶۶/۳ درصد بوده است. این داده بدن معنی است که پپتید ضد رگ زایی موجب بهبود اثر بخشی داروی پکلی تاکسل شده است.



شکل ۲- مهار رشد تومورهای کارسینومای پستان القا شده توسط رده سلولی 4T1 در موش Balb/c تحت تیمار با پکلی تاکسل و ترکیب پکلی تاکسل بعلاوه پپتید VGB3. موش‌های ماده با طول عمر ۵ تا ۷ هفته جهت بررسی اثر بخشی تیمار با پکلی تاکسل (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) یا ترکیب پکلی تاکسل (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بعلاوه پپتید VGB3 (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) مورد استفاده قرار گرفتند. Error bar نشان دهنده  $\pm SEM$  است.  $n = 5$ ;  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.0001$  \*\*\*.

جهت ارزیابی سمیت تیمارها وزن موش‌ها در دوره‌ی تیمار اندازه‌گیری شد. در پایان دوره آزمایش (روز ۳۰ پس از ایمپلنت)، وزن موش‌های تحت تیمار با پکلی تاکسل و ترکیب پکلی تاکسل بعلاوه پپتید دچار کاهش نشد (شکل ۳). اما در گروه کنترل (که PBS دریافت کردند) وزن موشها در انتهای دوره اندکی کاهش یافته است. همچنین وزن موش‌های گروه

کنترل در مقایسه با گروه‌های تیمار کمتر بوده است. که پیشنهاد می‌کند تیمارها در دوزهای مورد استفاده در این مطالعه غیر-سمی هستند.

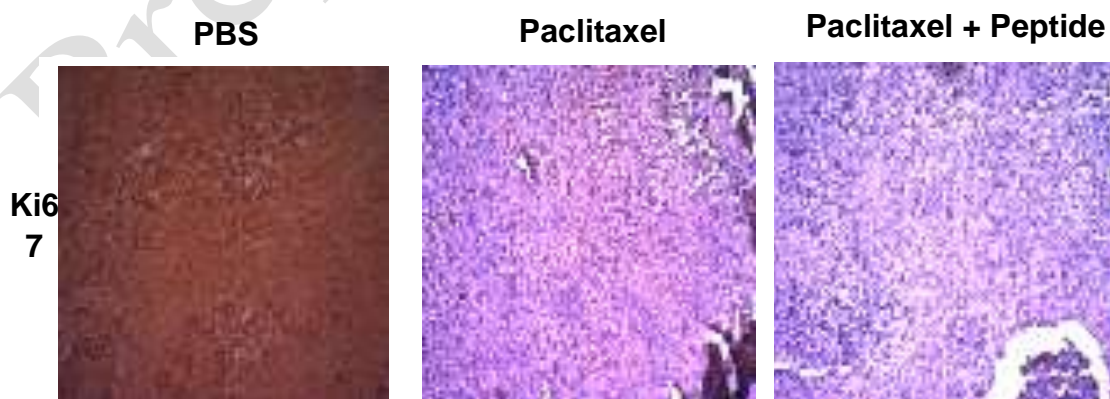


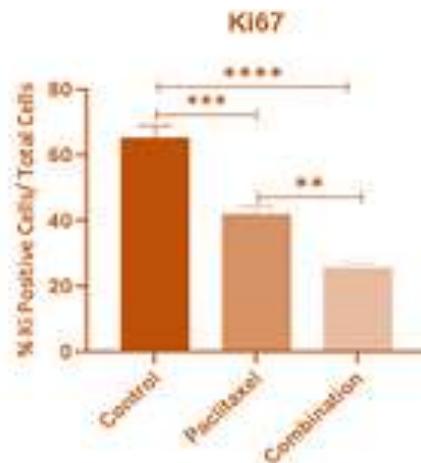
**شکل ۳- بررسی سمیت تیمارها.** وزن موش‌ها در طی دوره تیمار (مطابق شکل ۲) بعنوان یک شاخص غیر مستقیم سمیت اندازه‌گیری شد. تیمار با پکلی تاکسل (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و بصورت توام با پپتید (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و پکلی تاکسل (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) موجب کاهش وزن حیوانات نشد. Error bar نشان دهنده  $\pm$ SEM است.  $n = 5$ ؛  $P < 0.01$ ؛ \*\*؛ ns نشان‌دهنده عدم معنی داری است. آنالیز آماری به روش Two-way ANOVA انجام شد.

در مرحله بعد جهت شناسایی مکانیسم بهبود اثر بخشی پکلی تاکسل توسط پپتید VGB3 به مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی مارکرهای شاخص پرداخته شد.

### بررسی اثر تیمارها بر تکثیر سلولی

یکی از مارکرهای شاخص تکثیر سلولی به ویژه در سرطان پستان Ki67 است (۷). اثر تیمارها شامل داروی پکلی تاکسل و داروی پکلی تاکسل بعلاوه پپتید VGB3 بر تکثیر سلول‌های تومور، با رنگ آمیزی توسط آنتی بادی ضد Ki67، بعنوان مارکر شاخص تکثیر سلول‌های تومور پستان، مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



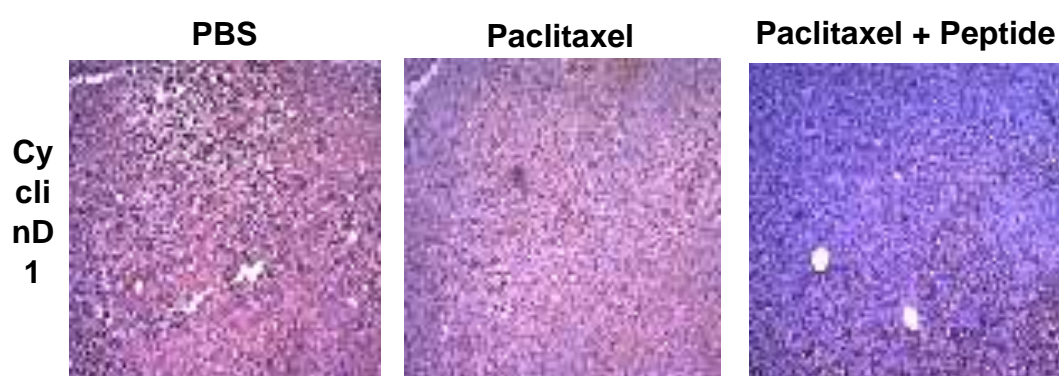


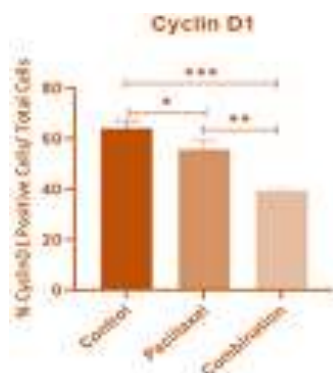
**شکل ۴- آنالیز ایمنو‌هیستوشیمی تکثیر سلولی.** تصاویر با بزرگنمایی  $\times 40$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر Ki67 صورت پذیرفت. تصاویر نمایش دهنده ی رنگ آمیزی Ki67 به عنوان نشانگر مرتبط با تکثیر سلولی است. تعیین کمی میزان بیان Ki67 با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm$ SEM است.  $n=3$ ;  $P<0.01$ ;  $P<0.001$ ;  $P<0.0001$ \*\*\*.

تکثیر سلول های توموری در هر دو گروه تومورهای تیمار شده در مقایسه با کنترل (PBS) به میزان قابل توجهی کاهش یافت و تفاوت معنی داری بین دو گروه تومور های تیمار شده مشاهده شد (گروهی که فقط داروی پکلی تاکسل را دریافت کرده است ( $P<0.001$ ); گروهی که علاوه بر داروی پکلی تاکسل پپتید نیز دریافت کرده است ( $P<0.0001$ )) (شکل ۴). بنابراین و طبق انتظار، گروه کنترل که تحت تیمار درمانی قرار نگرفته است، در شرایط بدخیمی قرار دارد و تکثیر سلول های توموری در آن بالا است، اما هر دو گروه تیمار از سطح بیان Ki67 پایین تری برخوردارند. از سوی دیگر مقایسه بین گروه های تیمار شده با دارو و درمان ترکیبی دارو و پپتید نشان می دهد که در حضور میزان سرکوب بیان Ki67 بیشتر است ( $P<0.01$ )، که تایید کننده اثر بخشی پپتید بر مهار تکثیر سلول های سرطانی است.

#### اثر تیمارها بر چرخه سلولی

پروتئین Cyclin D1 برای پیشرفت در فاز G1 چرخه سلولی ضروری است (۱۲). تولید بیش از حد این پروتئین در مراحل آغازین سرطان و پیشرفت تومور مشاهده شده است. تولید بیش از حد این پروتئین با بقای کمتر بیماران سرطانی و افزایش متاستاز در ارتباط است. بنابراین برای بررسی اثر تیمارها بر چرخه سلول های بافت تومور مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵).

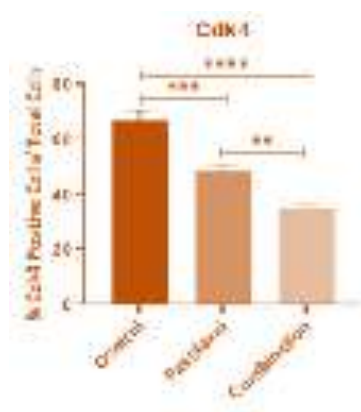
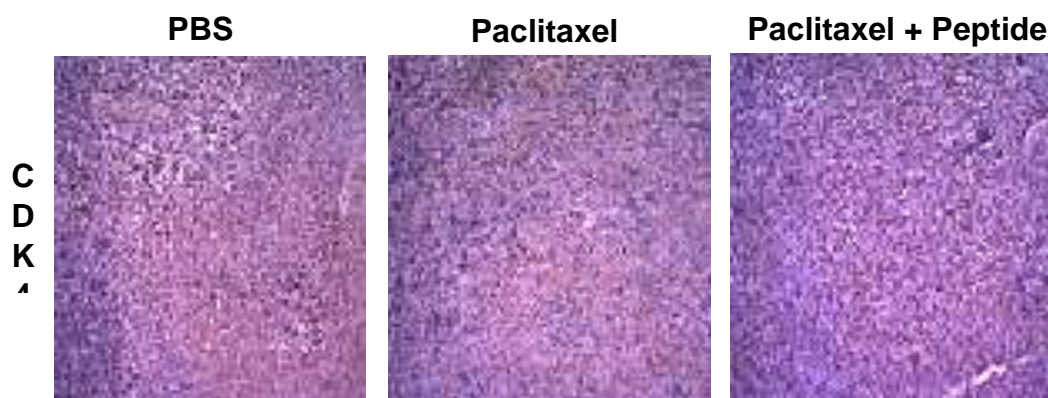




شکل ۵- آنالیز ایمنونوهیستوشیمی مارکر **Cyclin D1** چرخه سلولی. تصاویر با بزرگنمایی  $40\times$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر **Cyclin D1** صورت پذیرفت. تصاویر نمایش‌دهنده ی رنگ آمیزی **Cyclin D1** به عنوان نشانگر مرتبط با چرخه سلولی است. تعیین کمی میزان بیان **Cyclin D1** با استفاده از نرم افزار **ImageJ** صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار **Prism** انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm$ SEM است.  $n=3$ ;  $P<0.05$ ; \* ; \*\* ;  $P<0.001$ ;  $P<0.01$  ;\*\*\*

نتایج حاصل از رنگ آمیزی با آنی بادی علیه **Cyclin D1** نشان داد گروه کنترل شامل ۶۲ درصد سلول های **Cyclin D1**-مثبت و گروهی که فقط داروی پکلی تاکسل را دریافت کرده ۵۴ درصد سلول های **Cyclin D1**-مثبت را نشان داده ولی در گروه درمان ترکیبی این میزان به ۳۸ درصد سلول **Cyclin D1**-مثبت کاهش یافته است. بنابراین نتایج، چرخه سلولی در گروه های تیمار مهار شده است. همچنین گروه درمان ترکیبی کاهش بیشتری نسبت به درمان با پکلی تاکسل تنها نشان داده است ( $P<0.01$ ) (شکل ۵).

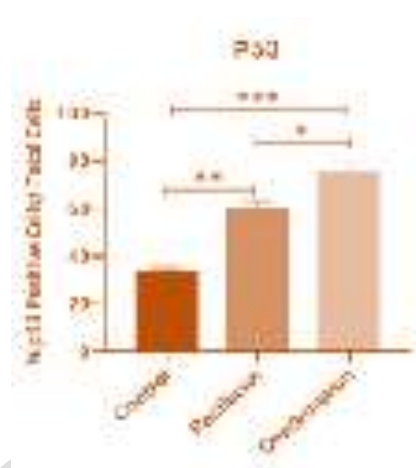
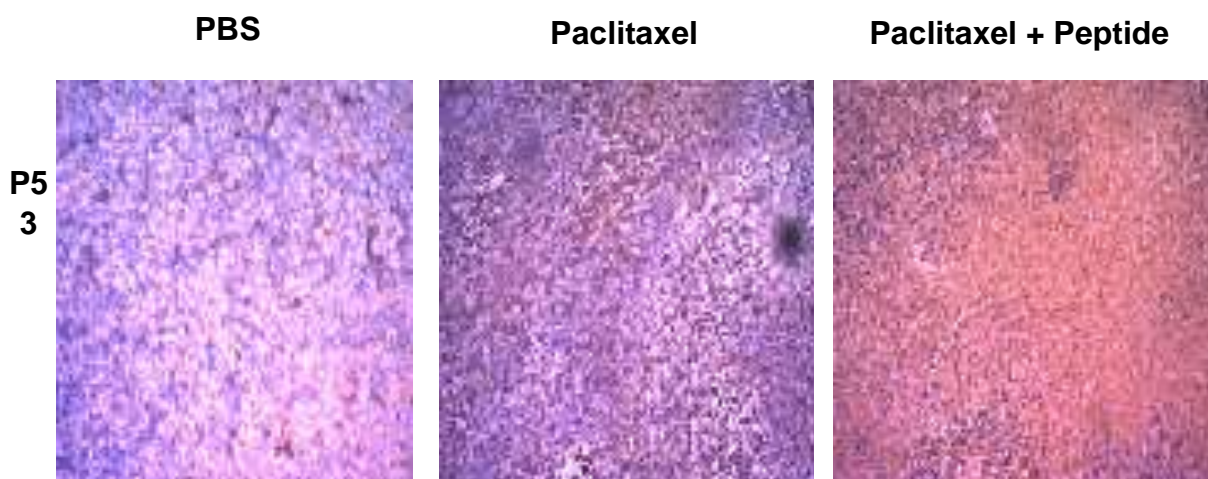
پروتئین **CDK4** (کیناز وابسته به سیکلین ۴) آنزیمی است برای پیشرفت فاز **G1** چرخه سلولی مهم است (۱۲). جلوگیری از فعالیت آنزیم **CDK4** تقسیم سریع سلول های سرطانی را هدف قرار می دهد. بررسی سطح بیان پروتئین **CDK4** در گروه های مختلف تیمار نشان دهنده کاهش این مارکر پس از تیمار با پکلی تاکسل ( $P<0.001$ ) و درمان ترکیبی با پکلی تاکسل و پیتید ( $P<0.0001$ ) نسبت به گروه کنترل (دریافت کننده **PBS**) بوده است (شکل ۶). از سوی دیگر درمان ترکیبی اثر مهارکنندگی بیشتری بر بیان **CDK4** نسبت به تیمار با پکلی تاکسل نشان داد ( $P<0.01$ ).



شکل ۶- آنالیز ایمنونوهیستوشیمی مارکر CDK4 چرخه سلولی. تصاویر با بزرگنمایی  $40\times$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر CDK4 صورت پذیرفت. تصاویر نمایش‌دهنده ی رنگ آمیزی CDK4 به عنوان نشانگر مرتبط با چرخه سلولی است. تعیین کمی میزان بیان CDK4 با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm$ SEM است.  $n=3$ ;  $P<0.01$  ;  $P<0.001$  ;  $****$  ;  $P<0.0001$

#### اثر تیمارها بر فاکتور آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و پروآپوپتوتیک P53

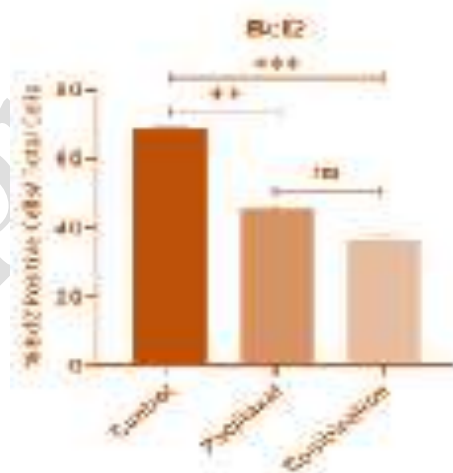
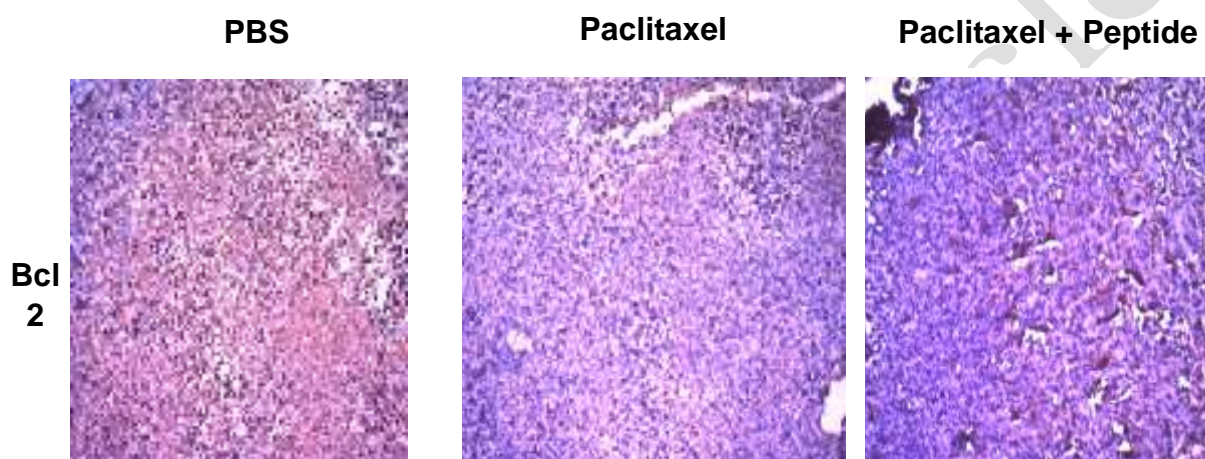
برای ارزیابی اینکه آیا مهار رشد تومور توسط داروی پکلی تاکسل و پپتید VGB3 با القای آپپتوز مرتبط است یا خیر، بافت های توموری با رنگ آمیزی بیو مارکرهای Bcl2 و P53 مورد آنالیز قرار گرفتند.



شکل ۷- آنالیز ایمنو هیستوشیمی مارکر P53 آپوپتوز. تصاویر با بزرگنمایی  $\times 40$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر P53 صورت پذیرفت. تصاویر نمایش دهنده ی رنگ آمیزی P53 به عنوان نشانگر مرتبط با آپوپتوز است. تعیین کمی میزان بیان P53 با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm$ SEM است.  $n=3$ ;  $P<0.05$ ; \*  $P<0.01$ ; \*\*  $P<0.001$  ;\*\*\*.

پروتئین P53 فعالیت آپوپتوزی دارد بدین معنی که بیان آن با القای آپوپتوز ارتباط مستقیم دارد (۲). نتایج حاصل از ایمنو هیستوشیمی نشان می دهد که هر دو تیمار پکلی تاکسل و پکلی تاکسل بعلاوه پپتید منجر به القای بیان این پروتئین در مقایسه گروه کنترل (PBS) شده اند (به ترتیب  $P<0.01$  و  $P<0.001$ ) (شکل ۷). از سوی دیگر حضور پپتید موجب افزایش القای آپوپتوز توسط پکلی تاکسل شده است ( $P<0.05$ ).

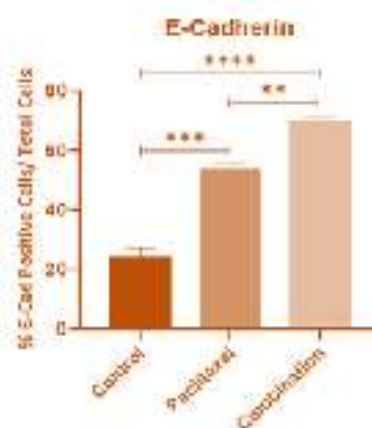
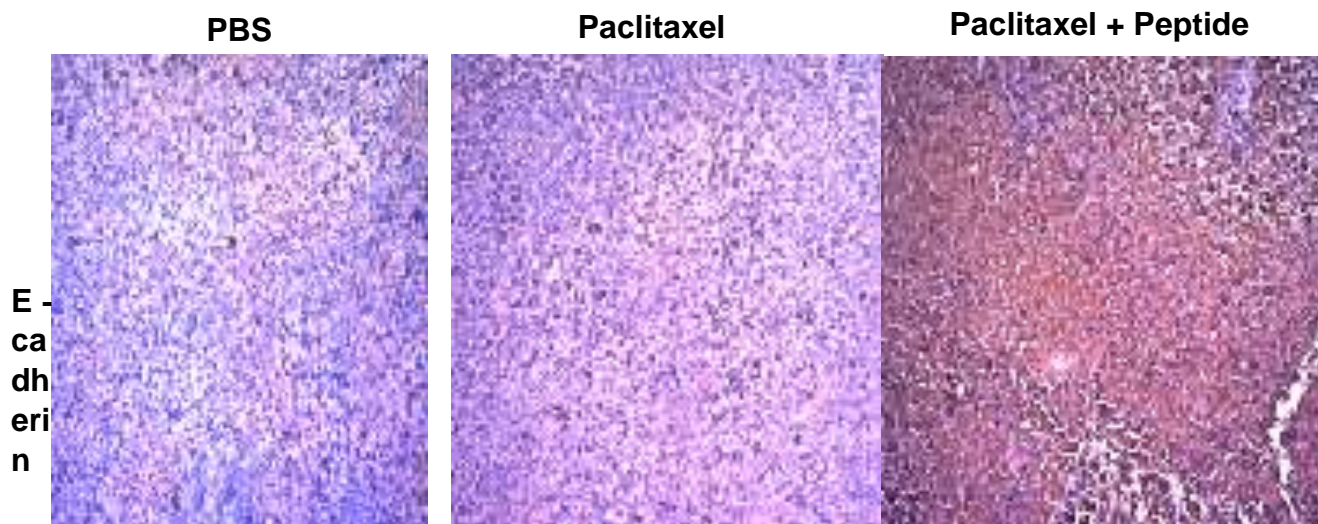
بر خلاف پروتئین P53، پروتئین Bcl2 عملکرد ضد آپوپتوزی دارد (۱۴). بنابراین، بیان آن با القای آپوپتوز رابطه عکس دارد. نتایج بررسی بیان این مارکر نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه PBS تعداد سلول‌هایی که به آنتی‌بادی علیه Bcl2 متصل شده‌اند در تیمارها کاهش یافته است (به ترتیب  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ) (شکل ۸). این نتایج در تایید داده‌های بدست آمده از بررسی مارکر P53 نشان می‌دهند که تیمارها موجب القای آپوپتوز شده‌اند.



شکل ۸- آنالیز ایمنو‌هیستوشیمی مارکر Bcl2 آپوپتوز. تصاویر با بزرگنمایی  $\times 40$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر Bcl2 صورت پذیرفت. تعیین کمی میزان بیان Bcl2 با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm SEM$  است.  $n=3$  ;  $P < 0.01$  ; \*\* ; \*\*\*  $P < 0.001$

## اثر تیمارها بر مارکرهای متاستاز

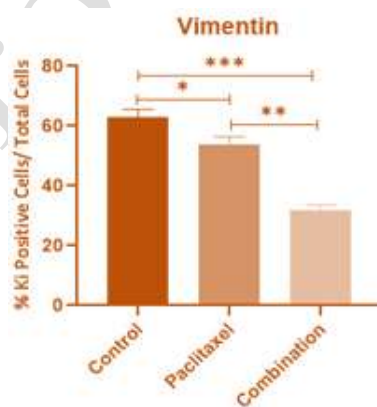
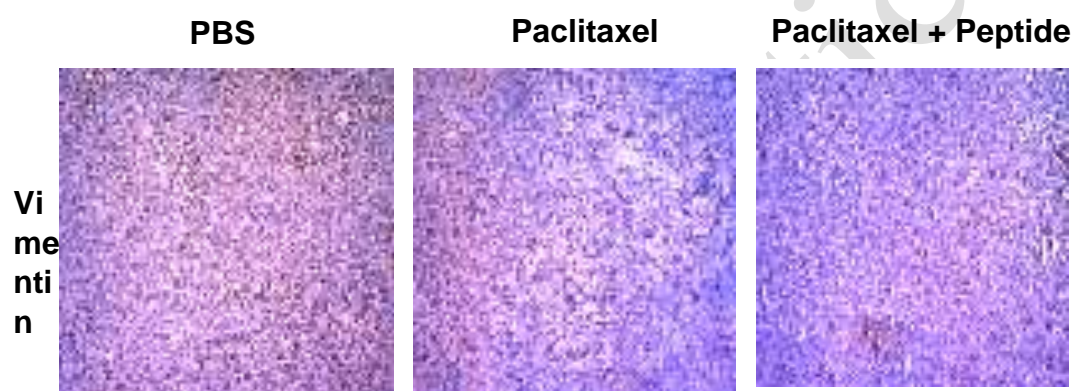
مولکول E-cadherin یک گلیکوپروتین است که از عرض غشاء عبور کرده و در اتصال سلول به سلول نقش اساسی را ایفا می کند (۱۸). بیان E-cadherin با پیشرفت بسیاری از تومورهای اپیتلیال ارتباط معکوس دارد. این مولکول می تواند در سرکوب تومور و جلوگیری از متاستاز تومور به دیگر قسمت های بدن نقش اساسی را ایفا کند.



شکل ۹- آنالیز ایمنونوهیستوشیمی مارکر E-Cadherin متاستاز. تصاویر با بزرگنمایی 40× و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر E-Cadherin صورت پذیرفت. تعیین کمی میزان بیان E-Cadherin با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده SEM ± است. n=3 ; \*\* P<0.01 ; \*\*\* P<0.001 ; \*\*\*\* P<0.0001

بر اساس نتایج آنالیز شکل ۹، میزان بیان E-Cadherin در گروه کنترل ۲۴ درصد، در گروه پکلی تاکسل ۵۵ درصد و در گروه درمان ترکیبی ۶۹ درصد است. افزایش قابل ملاحظه بیان E-Cadherin به معنای تمایل کمتر تومورهای تیمار شده نسبت به کنترل برای متاستاز است. همچنین، حضور پپتید منجر به کاهش تمایل به متاستاز در مقایسه با گروه پکلی تاکسل شده است.

پروتئین Vimentin یکی از شاخص های مهم انتقال از خصوصیات اپیتلیال به مزانشیمال است که در فرایند متاستاز انواع تومورها کلیدی است (۱۸). بیان این مارکر با تمایل به متاستاز رابطه مستقیم دارد، یعنی هر چه بیان آن بیشتر باشد تمایل به متاستاز هم بیشتر خواهد بود. بررسی در گروه های مورد مطالعه نشان داد که بیان Vimentin در تیمارهای پکلی تاکسل و درمان ترکیبی نسبت به کنترل کاهش یافته است (به ترتیب  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$ ).



شکل ۱۰- آنالیز ایمنووهیستوشیمی مارکر Vimentin متاستاز. تصاویر با بزرگنمایی  $40\times$  و با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 ساخت ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال ثبت شد. پس از انجام تیمارها مطابق با دزهای بیان شده در شکل ۲، آنالیز میزان بیان مارکر Vimentin صورت پذیرفت. تعیین کمی میزان بیان Vimentin با استفاده از نرم افزار ImageJ صورت گرفت و آنالیز با نرم افزار Prism انجام شد. Error bar نشان دهنده  $\pm SEM$  است.  $n=3$ ;  $P < 0.05$  \* ;  $P < 0.01$  \*\* ;  $P < 0.001$  \*\*\* .

## بحث

در این مطالعه نشان داده شد که داروی شیمی درمانی پکلی تاکسل در ترکیب با یک پپتید ضد رگ زایی موسوم به VGB3 به طور موثر رشد تومور متاستاتیک پستان القا شده توسط رده سلولی 4T1 را در مدل موشی به طور قابل توجهی و موثرتر از تیمار با داروی پکلی تاکسل به تنهایی بهبود می‌دهد. همچنین، بررسی مکانیسم اثر بخشی تیمارهای داروی پکلی تاکسل و پپتید ضد رگ‌زایی بعلاوه داروی پکلی تاکسل در مقایسه با تیمار کنترل (دریافت کننده PBS) نشان داد که مهار موثرتر رشد تومور در درمان ترکیبی مرتبط با تکثیر سلولی (کاهش بیان Ki67)، چرخه سلولی (کاهش بیان Cyclin D1 و CDK4)، القای آپوپتوز (افزایش بیان Bcl2 و کاهش بیان P53) و مارکرهای متاستاتیک (افزایش بیان E-Cadherin و کاهش بیان Vimentin) بوده است. اثر پپتید VGB3 بر مارکرهای مذکور در یک مطالعه اخیر هم نشان داده شده است (۹).

داروی پکلی تاکسل یک داروی متداول ضد سرطان است که از درخت سرخدار (*Taxus brevifolia*) بدست آمده است. این دارو پلیمرهای توبولین را پایدار می‌سازد و از جداسازی قطعات میکروتوبول جلوگیری می‌کند (۱۵). پپتید VGB3 که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است یک آنتاگونیست فاکتور رشد VEGF محسوب می‌شود. این پپتید با اتصال به دمین خارج سلولی گیرنده های VEGFR1 و VEGFR2 مانع از مسیر پیام رسانی فاکتورهای رشد VEGFA و VEGFB می‌شود. رده سلولی توموری مورد استفاده در این تحقیق رده 4T1 بوده که هر دو گیرنده مذکور را در سطح سلول بیان می‌نماید (۱۳). این بدان معنی است که پپتید ضد رگ زایی، علاوه بر اثر بر سلول های اندوتلیال و فرایند رگ زایی، قادر است مستقیماً بر خود سلول های توموری اثر مهار کنندگی داشته باشد. این مدعا در مطالعات گذشته مورد تایید قرار گرفته است (۸،۹).

مطالعات ایمونوهیستوشیمی این تحقیق مکانیسم هایی برای تقویت اثرات ضد توموری داروی پکلی تاکسل توسط پپتید ضد رگ زایی پیشنهاد می‌نماید. اندازه گیری مارکر مهم Ki67 بعنوان یک شاخص مهم تکثیر سلول های توموری نشان داد که تکثیر سلولهای تومور پستان تحت اثر درمان ترکیبی دچار سرکوب بیشتری نسبت درمان فقط با داروی شیمی درمانی پکلی تاکسل شده است. این اثر پپتید مربوط به نقش فاکتور رشد VEGF در القای مسیر تکثیر سلولی است. پپتید VGB3 با مهار گیرنده VEGFR2 موجب سرکوب مسیر RAS/RAF/MEK/ERK1/2، که تنظیم کننده تکثیر سلولی است، شده و تکثیر سلول های توموری را مهار می‌نماید (۹). در پایین دست پروتئین پیام رسانی ERK پروتئین های Cyclin D1 و CDK4 قرار دارند (۱۶). این دو پروتئین از عوامل مهم کنترل چرخه سلولی در فاز G1 هستند. بنابراین، سطح بیان آنها یک معیار مهم برای تکثیر سلول ها می باشد. نتایج بدست آمده نشان داد که پکلی تاکسل موجب سرکوب بیان این پروتئین ها شده است. به طور قابل توجهی، میزان این سرکوب در درمان ترکیبی شدت بیشتری یافته است. این یافته ضمن تایید داده مربوط به تکثیر سلولی بدست آمده از بیان Ki67 نشان از اهمیت تکثیر سلولی و مهار آن در داروهای ضد سرطان دارد.

یکی از مهمترین مسیرهای پیام رسانی گیرنده VEGFR2 مسیر PI3K/Akt/mTOR است (۱۷). این مسیر تاثیر بسیار تعیین کنندگی بر سرنوشت سلول از نظر زنده ماندن یا آپوپتوز دارد. بنابراین انتظار می رود سرکوب گیرنده VEGFR2 توسط پپتید با مهار مسیر پیام رسانی مذکور موجب مرگ سلولی شود. جهت بررسی این اثر دو مارکر مهم آپوپتوتیک P53 و آنتی آپوپتوتیک Bcl2 مورد بررسی قرار گرفتند. به طور موثری، در تومورهای تیمار شده با پپتید بعلاوه پکلی تاکسل نسبت به درمان با پکلی تاکسل تنها میزان بیان P53 افزایش و بیان Bcl2 کاهش بیشتری یافت. این نتایج در تایید یکدیگر نشان می‌دهند که درمان ترکیبی موجب القای بیشتر آپوپتوز در سلول های تومور شده است.

مدل توموری 4T1 سرطان پستان مورد استفاده در این تحقیق یک مدل متاستاتیک محسوب می‌شود (۸، ۱۹-۱۸). بر این اساس، یکی از شاخصه‌های اثر بخشی مارک‌های متاستاتیک E-Cadherin و Vimentin بوده‌اند. سطح بیان مارکر E-cadherin ارتباط عکس و مارکر Vimentin ارتباط مستقیم با تمایل به متاستاز تومور دارند (۹). بر اساس داده‌های هیستوپاتولوژی، پکلی تاکسل بیان E-cadherin را سرکوب و بیان Vimentin را افزایش داده است و این اثرات به طور قابل توجهی با حضور پپتید افزایش یافته است.

## نتیجه‌گیری

بنابر نتایج این تحقیق، مهار مسیر پیام‌رسانی VEGF توسط پپتید VGB3 سبب کاهش تمایل به متاستاز شده است. این اثرات با توجه به نقش VEGF در رگ‌زایی بعنوان یک پیش‌نیاز برای متاستاز و همچنین اهمیت آن در راه‌اندازی و کنترل سایر فرایندهای منجر به متاستاز قابل توضیح است (۲۰). در مجموع نتایج این تحقیق نشان داده است که درمان ترکیبی با داروی پکلی تاکسل و یک عامل ضد رگ‌زایی راهکاری موثر در درمان سرطان پستان سه‌گانه منفی (triple negative) محسوب می‌شود.

## تضاد منافع

این پژوهش شامل هیچ‌گونه تعارض منافی نیست.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند اعلام می‌دارند.

## منابع

- 1- Adams RH, Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 464-478. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- 2- Allahmoradi H, Asghari SM, Ahmadi A, Assareh E, Nazari M. Anti-tumor and anti-metastatic activity of the FGF2 118-126 fragment dependent on the loop structure (2022) *Biochemical Journal*. 479 (12) : 1285-1302. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210830>
- 3- Asghari SM, Ehtesham S (2020). Method of synthesizing antagonist peptides for cell growth *United States Patent and Trademark Office*, Patent No 10745454.
- 4- Assareh E, Mehrnejad F, Mansouri K, Esmaeili Rastaghi AR, Naderi-Manesh H, Asghari SM. A cyclic peptide reproducing the  $\alpha 1$  helix of VEGF-B binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 and inhibits angiogenesis and tumor growth (2019) *Biochem J*. 476 (4): 645-663. <http://doi.org/10.1042/BCJ20180823>
- 5- Cui H, Arnst K, Miller DD, Li W (2020). Recent advances in elucidating paclitaxel resistance mechanisms in non-small cell lung cancer and strategies to overcome drug resistance. *Current Medicinal Chemistry* 27 (39):6573-6595. <https://doi.org/10.2174/0929867326666191016113631>.
- 6- De Palma M, Biziato D & Petrova T. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis (2017). *Nature Reviews Cancer* 17, 457-474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
- 7- Farzaneh Behelgard M, Zahri S, Mashayekhi F, Mansouri K, Asghari SM. A peptide mimicking the binding sites of VEGF-A and VEGF-B inhibits VEGFR-1/-2 driven angiogenesis, tumor growth and metastasis (2018). *Scientific Reports* 8(1):17924. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36394-0>

- 8- Gallego-Jara J, Lozano-Terol G, Sola-Martínez RA, Cánovas-Díaz M, de Diego Puente T. A (2020) Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules* 17;25(24):5986. <http://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- 9- Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis (2011) *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4:51. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>
- 10- Ma J, Waxman DJ (2008). Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(12):3670-84. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0715>
- 11- Montalto FI, De Amicis F (2020). Cyclin D1 in Cancer: A molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma. *Cells* 9(12):2648. <https://doi.org/10.3390/cells9122648>
- 12- Namjoo M, Ghafouri H, Assareh E, Aref AR, Mostafavi E, Hamrahi Mohsen A, Balalaie S, Broussy S, Asghari SM (2023). A VEGFB-Based peptidomimetic inhibits VEGFR2-mediated PI3K/Akt/mTOR and PLCγ/ERK signaling and elicits apoptotic, antiangiogenic, and antitumor activities. *Pharmaceuticals* 16 (6), 906. <https://doi.org/10.3390/ph16060906>
- 13- Sadremomtaz A, Ali AM, Jouyandeh F, Balalaie S, Navari R, Broussy S, Mansouri K, Groves MR, Asghari SM (2020). Molecular docking, synthesis and biological evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) B based peptide as antiangiogenic agent targeting the second domain of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR1D2) for anticancer application. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 76. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0177-z>
- 14- Sadremomtaz A, Mansouri K, Alemzadeh G, Safa M, Rastaghi AE, Asghari SM (2018). Dual blockade of VEGFR1 and VEGFR2 by a novel peptide abrogates VEGF-driven angiogenesis, tumor growth, and metastasis through PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*. 62 (12): 2688-2700 <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.08.013>
- 15- Vimalraj S. A concise review of VEGF, PDGF, FGF, Notch, angiopoietin, and HGF signalling in tumor angiogenesis with a focus on alternative approaches and future directions (2022) *International Journal of Biological Macromolecules* 221:1428-1438. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.129>
- 16- Wallsh OJ, Gallemore RP (2021). Anti-VEGF-Resistant Retinal Diseases: A Review of the Latest Treatment Options. *Cells* 10(5): 1049; <https://doi.org/10.3390/cells10051049>
- 17- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 93(9):2325-7. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- 18- Dehghani S., Salimi M. and Nikoonahad lotfabadi N (2019). Evaluation of anti-tumor effect of chemical compound [N'-(5- nitrothiophen-2-YL) methylene]-2(phenylthio)benzohydrazide] in breast cancer mouse model. *Cellular and Molecular Researches* (Iranian Journal of Biology). 32(2): 198-207. [https://dori.net/dor/20.1001.1.23832738.1398.32.2.6.1.\(in.persian\).](https://dori.net/dor/20.1001.1.23832738.1398.32.2.6.1.(in.persian).)
- 19- Choori, M., Boozarpour, S., moradi, A., Jorjani, E. (2018) Investigation of POU5F1 and NANOG gene expression in colon cancer cell line (Caco-2) treated by dendrosomal nano-curcumin. *Cellular and Molecular Research* (Iranian Journal of Biology), 31(3), pp. 292-301. [https://dori.net/dor/20.1001.1.23832738.1397.31.3.3.3.\(in.persian\).](https://dori.net/dor/20.1001.1.23832738.1397.31.3.3.3.(in.persian).)
- 20- Zanjanchi P, Asghari SM, Mohabatkar H, Shourian M, Shafiee Ardestani M (2022) Conjugation of VEGFR1/R2-targeting peptide with gold nanoparticles to enhance antiangiogenic and antitumoral activity. *Journal of Nanobiotechnology* 20(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01198-4>

## Improving the anti-tumor effect of paclitaxel by anti-angiogenic peptide in mouse model

Mahsa Ghyasian Abyaneh<sup>1</sup>, Sorour Ramezanpour<sup>2</sup>, Somayeh Ehtesham<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, K. N. Toosi University of Technology, Tehran, Iran.

### Abstract

Anti-angiogenic agents improve the effect of cytotoxic drugs. In this study, the effect and mechanism of anti-cancer activity of an anti-angiogenic peptide, which specifically binds to VEGFR1 and VEGFR2 receptors and suppresses their signaling pathway, is investigated as a combination treatment with paclitaxel. The tumor model was breast carcinoma induced by a murine 4T1 cell line. Tumor-bearing mice were treated intravenously with paclitaxel, paclitaxel plus peptide (called VGB3), and PBS as a control from the fourteenth to the thirtieth days after tumor implantation (n=6). As a result of the treatments, paclitaxel effectively inhibited the growth of tumors, and the inhibition improved in the combination treatment with paclitaxel and peptide. Investigating the mechanism of action of treatments by immunohistochemistry and using antibodies against Ki67 (tumor cell proliferation marker), Cyclin D1 and CDK4 (cell cycle markers), P53 and Bcl2 (apoptotic markers) and E-Cadherin and Vimentin (metastasis markers) showed that, in tumor tissues, combined treatment more effectively inhibited the proliferation and the cell cycle of tumor cells, induced apoptosis and reduced the metastatic potential. According to these results, the combined treatment with the chemotherapy drug paclitaxel and anti-angiogenic peptide is more effective than the treatment with the chemotherapy drug alone, and the improvement of the potency of the combination therapy is related to inhibiting the proliferation, cell cycle arrest, apoptosis induction, and inhibiting metastasis in the tumor.

**Keywords:** Breast cancer, Anti-angiogenic peptide, Paclitaxel, Cell cycle, Apoptosis