

سمیت سلولی انتخابی و مکانیسم‌های آپوپتوز تیلاپیا پسیدین ۴ (TP4) در سلول‌های سرطان پروستات انسانی: القای آپوپتوز وابسته به ROS

رشید علیجانی اردشیر^{۱*} و داریوش غلامی^۲

^۱ گروه زیست فناوری دریا، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

^۲ گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی در درمان سرطان رویکرد درمانی جدیدی است که برای درمان انواع مختلف سرطان مورد توجه تحقیقات علمی است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک پپتید ضد میکروبی تیلاپیا پسیدین ۴ (TP4) و بررسی مکانیسم‌های مولکولی آپوپتوز آن در رده سلولی سرطان پروستات انسانی PC3 انجام شد.

روش کار: سلول‌های PC3 به سه گروه سلول‌های PC3 تیمار نشده، سلول‌های تیمار شده با IC₅₀ ۰/۵ و IC₅₀ ۰/۲۵ تقسیم شدند. بعد از تیمار، شاخص‌های استرس اکسیداتیو، سنجش آسیب DNA با روش ستاره دنباله دار و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان از اثر مهارتی TP4 بر تکثیر سلولی PC3 پس از ۲۴ ساعت (IC₅₀ = ۵۰/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر) بدون هیچ سمیت سلولی در سلول‌های طبیعی پروستات داشت. مقدار شاخص انتخاب (SI) از ۲ فراتر رفت که نشان دهنده عملکرد اختصاصی بالای TP4 برای سلول‌های سرطانی است. تیمار سلول‌های PC3 با ۰/۲۵٪ و ۰/۵۰٪ از مقدار IC₅₀ برای TP4 باعث آپوپتوز و تکه تکه شدن DNA در سلول‌های PC3 شد. این القا آپوپتوز با افزایش بیان ژن‌های القا کننده آپوپتوز (Bax، P53، Caspas 3) و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl2، افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژنی داخل سلولی (ROS) و محتوای مالون دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با گروه کنترل همراه بود (P < 0.05).

نتیجه‌گیری: TP4 می‌تواند از طریق یک مسیر وابسته به ROS، آپوپتوز را در سلول‌های سرطان پروستات القا کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، پپتید ضد میکروبی، آپوپتوز، تیلاپیا پسیدین ۴، آسیب به DNA

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: r.alijani@ausmt.ac.ir

مقدمه

سرطان پروستات (PCa) یک بدخیمی ناتوان کننده در جمعیت مردان در سراسر جهان است. طبق جدیدترین آمار در دنیا، ۱،۴۱۴،۲۵۹ مرد تا پایان سال ۲۰۲۰ برای PCa مثبت تشخیص داده شده‌اند. در واقع، PCa در ۷/۳ درصد از کل ۱۹،۲۹۲،۷۸۹ مورد سرطان‌های مختلف تشخیص داده شده مثبت نقش داشته است. علاوه بر این، PCa همچنین مسئول ۳۷۵۳۰۴ مرگ تایید شده در سراسر جهان تا پایان سال ۲۰۲۰ بود (4). معمولاً شروع بیماری در مردان در سنین ۶۰ تا ۷۰ سالگی اتفاق می‌افتد که به طور قابل توجهی مرگ و میر و عوارض PCa را افزایش می‌دهد (1). علیرغم پیشرفت چشمگیر در درمان‌های کلاسیک

سرطان، این رویکردها دارای محدودیت‌هایی مانند عوارض جانبی قابل توجه و هدف‌گیری غیرانتخابی اکثر داروهای ضد سرطانی بوده که مانع از کارایی درمانی آنها می‌شود (3, 27). در سال‌های اخیر، درمان هدفمند به دنبال جایگزین‌های طبیعی و ایمن برای کاهش عوارض جانبی مرتبط با داروهای ضد سرطان بوده و توجه زیادی را به خود جلب کرده است (2, 5, 9, 21).

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) به عنوان یک جایگزین بالقوه برای درمان سرطان نوید بخش هستند. AMPها پپتیدهای طبیعی هستند که در طیف گسترده‌ای از موجودات زنده سنتز می‌شوند. مطالعات بیوشیمیایی فراوانی انجام شده است که نشان دهنده نقش تخصصی آنها در مکانیسم‌های دفاعی ایمنی بوده که منجر به نامگذاری جدید آنها به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان^۱ (HDPs) شده است (6, 3). AMPها چندین ویژگی ساختاری مشترک دارند. اول، آنها معمولاً دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون با طولی بین ۵ تا ۵۰ اسید آمینه هستند. دوم، آنها خواص کاتیونی را در pH خنثی نشان می‌دهند، سوم، AMPها دارای بخش قابل توجهی از دنباله‌های آبریز هستند. در نهایت، آنها دارای یک ساختار آمفی‌پاتیک می‌باشند (29). ماهیت ساختار آمفی‌پاتیک AMPها برهمکنش‌های الکترواستاتیکی آنها با مولکول‌های آنیونی موجود بر روی غشای پلاسمایی سلول‌های میکروبی یا سرطانی را تسهیل می‌کند (27). برخلاف داروهای شیمی درمانی معمولی که به سلول‌های سالم آسیب می‌رسانند، AMPها هدف‌گیری انتخابی سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهند که در نتیجه سمیت کمتری نسبت به انواع سلول‌های غیر سرطانی ایجاد می‌کند (27, 28). پپتید ضد میکروبی دریایی TP4، مشتق شده از تیلایپای رودخانه نیل (*Oreochromis niloticus*)، عملکردهای بیولوژیکی متنوعی را نشان می‌دهد (10). این پپتیدها در عین فعالیت ضد باکتریایی، در تعدیل سیستم ایمنی، و ارتقاء بهبود زخم نیز نقش دارند (20). علاوه بر این، TP4 به دلیل اثرات ضد سرطانی قوی خود که در سلول‌های گلیوبلاستوما (24)، سلول‌های سرطان سینه سه‌گانه منفی (27)، و سلول‌های سرطانی غیرکوچک ریه انسان (26) نشان داده است، توجه تحقیقات اخیر را به خود جلب کرده است. در حالی که پتانسیل TP4 در از بین بردن سلول‌های سرطانی امیدوارکننده است، مکانیسم‌های خاص سلولی که زیربنای اثرات ضد توموری آن می‌باشند ناشناخته باقی مانده است. به دست آوردن درک جامع از اثرات مولکولی و سلولی TP4 بر سلول‌های سرطانی برای پیشبرد کاربرد دارویی آن بسیار مهم است. این مطالعه با هدف بررسی پتانسیل ضد سرطانی TP4 در برابر سلول‌های سرطان پروستات PC3 و بررسی مکانیسمی مسیر آپوپتوز و وضعیت آنتی‌اکسیدانی پس از تیمار این سلول‌های سرطانی با پروتئین TP4 انجام شده است.

مواد و روشها

مواد و ترکیبات مورد استفاده

پپتید ماهی تیلایپا پیسیدین ۴ (TP4) که به صورت هدیه از مرکز تحقیقات مقاومت ضد میکروبی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (مشهد، ایران) دریافت شد، به روشی که توسط نشانی و همکاران (۲۰۱۸) ارائه شده است، سنتز شده بود (19). TP4 در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره شده و از نور محافظت گردید. سالیین بافر فسفات (PBS)، RPMI-1640 محیط ال-گلوتامین، و آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (Biowest Maine et Loire، فرانسه)، سرم جنین گاوی (FBS) (Seralab، بریتانیا)،

^۱Antimicrobial peptides

^۲Host defense peptides

^۳Tilapia Piscidin 4

^۴Tilapia piscidin 4

تریپسین، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و معرف ۳-(۴،۵)-دی متیل تiazول-3-(z-y1)-،-5دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) از سیگما-آلدریج خریداری شد.

کشت سلول

رده سلولی سرطان پروستات انسان PC3 و رده سلولی پروستات نرمال انسان PrEC-31 از مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل (مازندران، ایران) تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 حاوی ال-گلوتامین، ۱۰% FBS (سرم جنین گاوی) و ۱٪ آنتی بیوتیک کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در یک اتمسفر مرطوب حاوی CO₂ ۵٪ برای رشد انکوبه شدند (نئوژن، ایران). کشت فرعی سلول‌ها هر ۲ تا ۳ روز یکبار انجام شد و بررسی دوره‌ای آلودگی با استفاده از میکروسکوپ معکوس انجام شد.

ارزیابی بقای سلولی

سنجش بقای سلول‌های PC3 و PrEC-31 پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف TP4 به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT (کیت MTT، کالازیسیت، DMA500) ارزیابی شد. سلول‌ها در سه تکرار در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم 5×10^3 سلول در هر چاهک کشت شدند. پس از انکوباسیون در طول شب، سلول‌ها با TP4 در غلظت‌های ۰ (۰/۵٪) DMSO، ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد تا امکان تبدیل MTT به فرمازان نامحلول توسط دهیدروژنازهای سلولی زنده فراهم شود. مایع رویی خارج شد و فورمازان داخل سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک DMSO به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق حل شد. جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) اندازه‌گیری شد. بقای سلولی با استفاده از فرمول: درصد زنده ماندن سلول = (میانگین جذب در چاهک‌های آزمایش / میانگین جذب در چاهک‌های شاهد) $\times 100$ مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از آن، منحنی‌های بقا برای هر رده سلولی بر اساس همبستگی بین غلظت TP4 و زنده‌مانی ترسیم شد (28). برای تعیین غلظت مهاری ۵۰٪ (IC₅₀)، لازم است منحنی‌های غلظت-پاسخ برای هر دوز ایجاد شود. انتخاب سیتوتوکسیک TP4 با استفاده از شاخص انتخاب^۵ (SI)، با استفاده از معادله محاسبه زیر ارزیابی شد:

$$SI = IC_{50} \text{ سلول های غیر سرطانی} / IC_{50} \text{ سلول های سرطانی}$$

در این شاخص گزینش پذیری بیشتر از ۲ نشان دهنده سطح بالایی از گزینش پذیری است (22).

طراحی آزمایش

سلول‌های PC3 به سه گروه تقسیم شدند. سلول‌های PC3 تیمار نشده به عنوان سلول‌های کنترل (Cnt) در نظر گرفته شدند، در حالی که در دو گروه دیگر، سلول‌ها با IC₅₀ ۰/۵ و IC₅₀ ۰/۲۵ تیمار شدند. سلول‌ها در انکوباتور CO₂ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند.

برآورد گونه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی

^۵Selectivity index

گونه‌های اکسیژن فعال درون سلولی (ROS) با استفاده از روشی که قبلاً شرح داده شده بود شامل کاوشگر فلورسنت، ۲۰،۷۰- دی‌کلروفلورسئین دی‌استات (DCFDA) اندازه‌گیری شد (7). سلول‌ها تحت تیمار قرار گرفتند و متعاقباً به مدت ۲ ساعت در معرض ۲۵ میکرومولار H_2O_2 قرار گرفتند. پس از شستشو با PBS، DCFDA (۵ میکرومولار) به سلول‌ها اضافه شد و سپس در تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از شست و شوی مجدد سلول‌ها با بافر PBS، شدت فلورسانس DCFDA با استفاده از یک میکروپلیت خوان فلورسانس اندازه‌گیری شد. سطوح ROS داخل سلولی به عنوان درصد کنترل بیان شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای MDA

فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (شرکت پادگین طب، ZB-SOD96) و کاتالاز (CAT) (شرکت پادگین طب، ZB-CAT96) و محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) (شرکت پادگین طب، ZB-MDA96) در سلول‌های PC3 با استفاده از روش‌های ELISA و کیت‌های تجاری موجود (ZellBio GmbH، آلمان) بر اساس پروتکل شرکت سازنده برای سنجش‌ها ارزیابی شد (22).

سنجش آسیب DNA با روش ستاره دنباله دار

پس از تیمار سلول‌های PC3 با TP4، برای ارزیابی آسیب به DNA از کیت سنجش کامت (Cell Biolabs، STA-355، آمریکا) بر طبق دستورالعمل‌های شرکت سازنده، استفاده گردید و سنجش طول دنباله حاصل از آسیب به DNA مطابق با مطالعه قبلی انجام شد (20).

تجزیه و تحلیل بیان ژن

RNA کل از سلول‌ها با استفاده از معرف Trizol (شرکت کایژن، FPLT034.0100) با استفاده از پروتکل معمول انجام شد و غلظت و یکپارچگی RNA به ترتیب با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل ۱ درصد تعیین شد. سطح بیان ژن‌های Bax، Bcl-2، Caspase 3 و p53 از طریق رونویسی معکوس با RevertAid H ترانس‌کریپتاز معکوس، و به دنبال آن qPCR با استفاده از کیت سایبرگرین مسترمیکس (شرکت یکتا تجهیز آزما، YT2551) و پرایمرهای اختصاصی ارزیابی شد (جدول ۱). مخلوط qPCR (۲۵ میکرولیتر) شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۱۲،۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green Master Mix بود. چرخه حرارتی شامل یک مرحله اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۵ چرخه جداسازی دو زنجیره مکمل در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه بود. بیان نسبی ژن‌های هدف به ژن رفرنس GAPDH نرمال شد و با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (19).

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

Gene	توالی پیشرو	توالی پس رو
Bax	5' GGACGAACTGGACAGTAACATGG3'	5' GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC3'

Bcl2	5' TTGATGGGATCGTTGCCTTATGC3'	5' CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTG3'
P53	5' TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC3'	5' AGGACAGGCACAAACACGCACC3'
Caspase3	5' GAAGCGAATCAATGGACTCTGG3'	5' GACCGAGATGTCATTCCAGTGC3'
GAPDH	5'GGTGAAGGTCGGAGTCAACG3'	5'TGAAGGGGTCATTGATGGCAAC3'

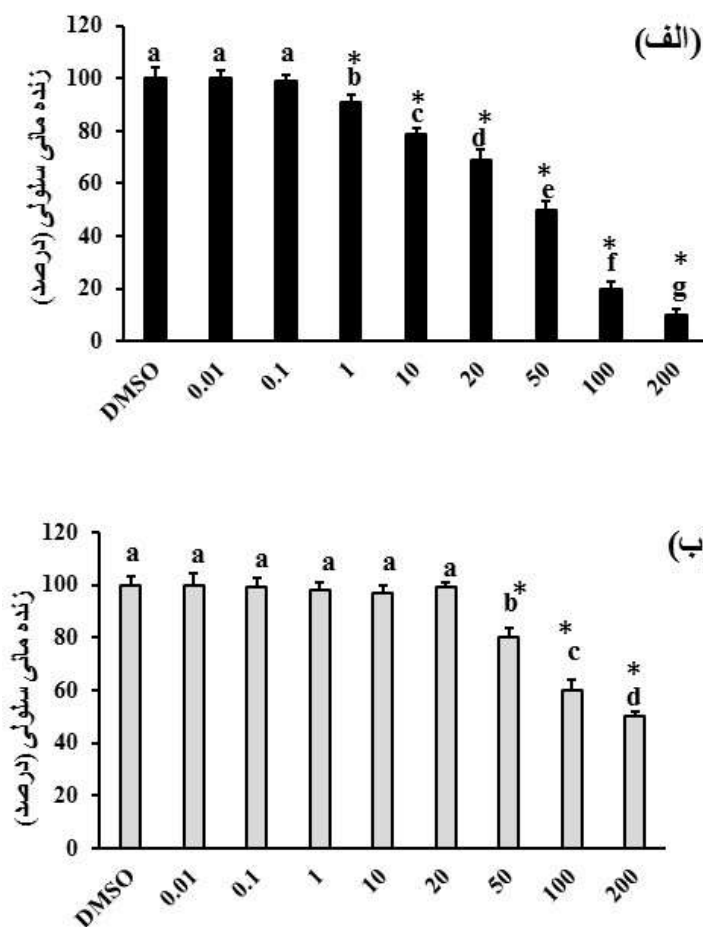
تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) از طریق برنامه JAMOWI (نسخه ۲,۲,۳,۰) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵٪ ($P < 0.05$) استفاده شد. قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزیابی شد، در حالی که از آزمون Levene برای بررسی واریانس استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) تکرار از آزمایش‌های مستقل ارائه شد.

نتایج

سمیت سلولی

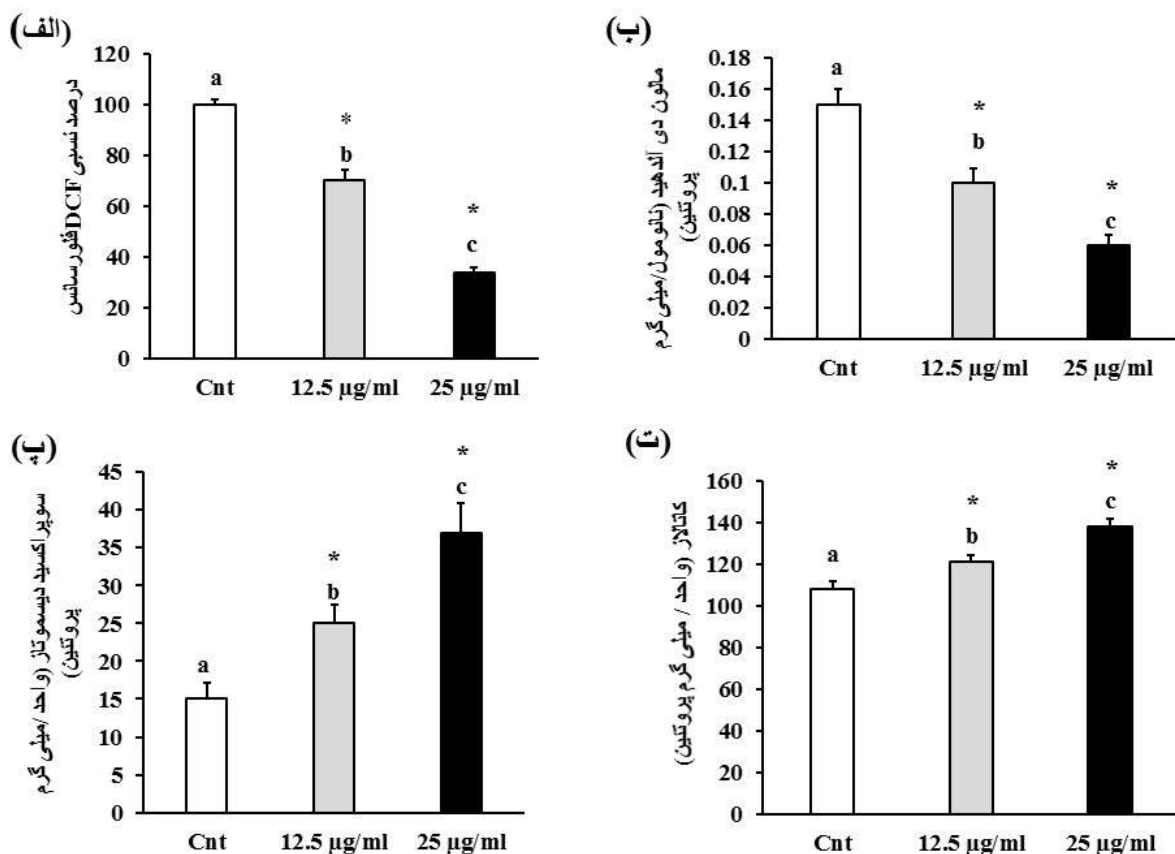
آزمون MTT بر روی سلول‌های PC3 و PrEC-31 برای ارزیابی اثرات TP4 در غلظت‌های مختلف پس از یک دوره انکوباسیون ۲۴ ساعته انجام شد. قابلیت زنده ماندن سلولی (درصد) برای هر رده سلولی در شکل ۱ نشان داده شده است. داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که پپتید TP4 اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز را بر روی رده‌های سلولی آزمایش شده در ۲۴ ساعت پس از تیمار با TP4 نشان داد. مقادیر IC_{50} TP4 برای سلول‌های PC3 و PrEC-31، به ترتیب ۵۰/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۹۸/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. مقدار شاخص انتخاب (SI) TP4 برای سلول‌های PC3 پس از ۲۴ ساعت درمان ۳,۹۶ بود که اختصاصی بودن آن را نسبت به رده سلولی MCF-7 نشان داد.



شکل ۱. فعالیت سیتوتوکسیک (TP4) در برابر سلول‌های PC3 (الف) و PrEC-31 (ب) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. هر مقدار نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار است ($n=3$). گروه‌های بی با حروف مختلف به طور قابل توجهی متفاوت هستند ($P<0.05$). ستاره تفاوت معنی دار هر گروه را با گروه کنترل (۰/۵ درصد DMSO) را نشان می‌دهد ($P<0.01$).

شاخص‌های استرس اکسیداتیو

میزان ROS داخل سلولی، محتوای MDA و وضعیت آنتی‌اکسیدانی درمان با دوزهای زیر کشنده TP4 منجر به افزایش سطح درون سلولی محتوای ROS و MDA در سلول‌های MCF-7 در مقایسه با گروه کنترل شد ($P<0.05$) (شکل ۲). علاوه بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل توجهی را نشان داد ($P<0.05$) (شکل ۲). بارزترین تغییرات در دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر TP4 (IC_{50} ۵۰٪) مشاهده شد (شکل ۲).

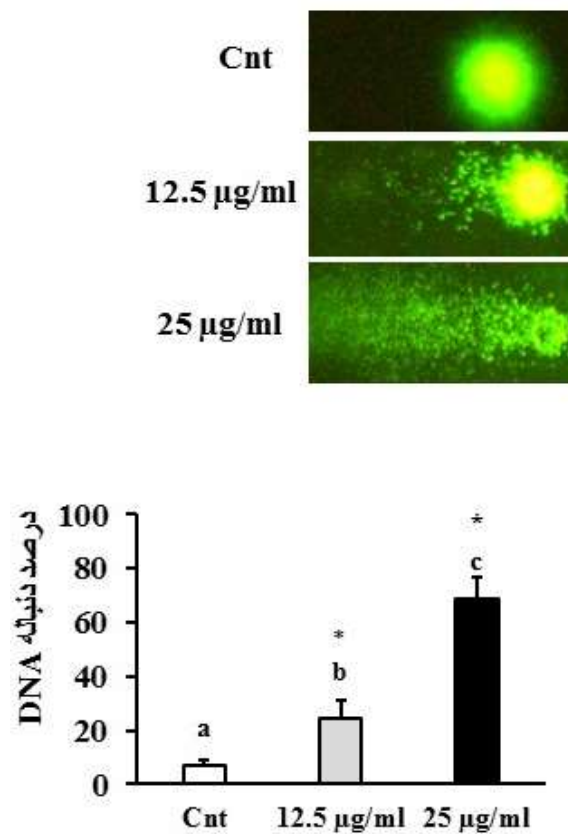


شکل ۲. اثر تیمار (TP4) در غلظت‌های ۲۵٪ و ۵۰٪ مقدار IC50 بر سطوح گونه‌های اکسیژن فعال داخل سلولی (ROS) (الف)، محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) (ب) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دی‌سموتاز (SOD) (پ) و کاتالاز (CAT) (ت) در سلول‌های PC3. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شده است. هر آزمایش در سه تکرار، با سه آزمایش مستقل انجام شد (n = 6). گروه‌هایی که با حروف مختلف برچسب‌گذاری شده‌اند، تفاوت‌های معنی‌داری را با هم نشان می‌دهند (P < 0.05). ستاره تفاوت معنی‌دار هر گروه را با گروه کنترل نشان می‌دهد (P < 0.01).

بررسی آسیب به DNA

تیمار با ۲۵٪ و ۵۰ درصد TP4IC50 منجر به افزایش شکستگی DNA و افزایش طول دم در آزمون ستاره دنباله دار شد که از گروه کنترل پیشی گرفت (شکل ۳) (P < 0.05). بیشترین افزایش درصد طول دم در آزمون ستاره دنباله دار مربوط به تیمار ۵۰ درصد TP4IC50 بود (شکل ۳).

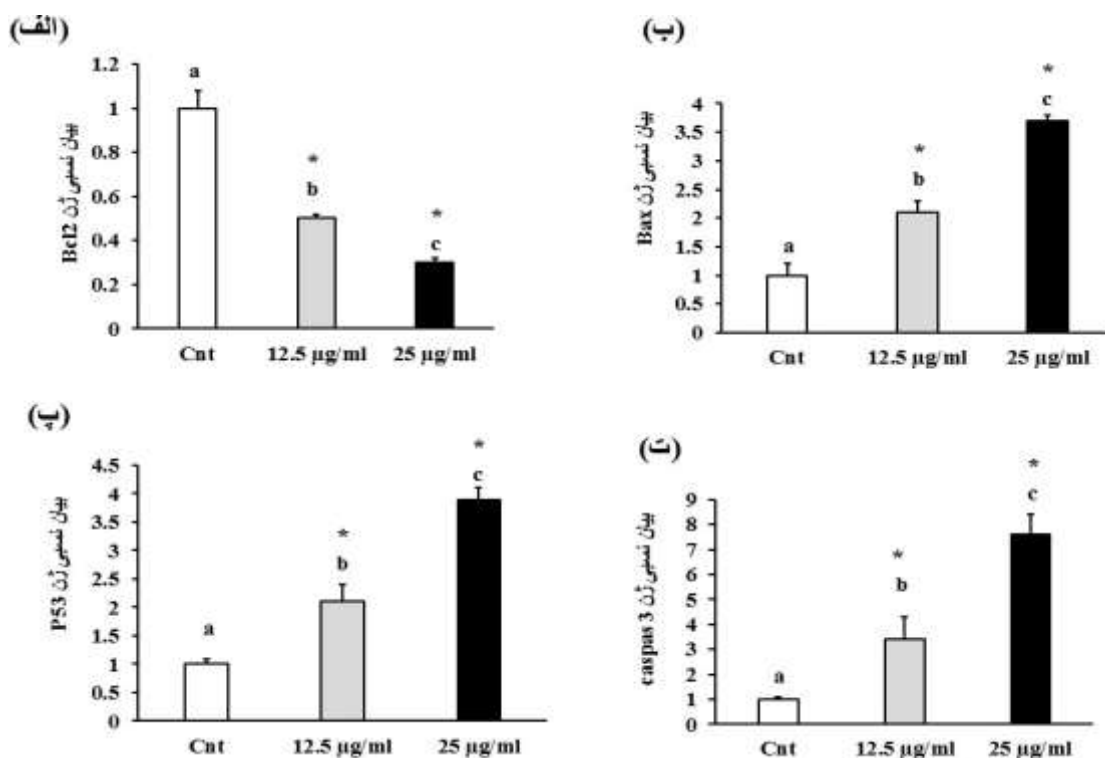
شکل ۳. نتایج سنجش ستاره دنباله دار که تأثیر تیمار (TP4) را بر سلول‌های PC3 در غلظت‌های ۲۵٪ و ۵۰٪ از IC50 را به مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. تصویر پایینی کمیّت درصد دم DNA را در ۱۰۰ سلول نشان می‌دهد. میانگین ± انحراف معیار (SD). گروه‌هایی که با



حروف مختلف برجسب‌گذاری شده‌اند، تفاوت‌های معنی‌داری را در با هم نشان می‌دهند ($P < 0.05$). ستاره تفاوت معنی‌دار هر گروه را با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.01$).

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز

تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که تیمار با ۲۵٪ و ۵۰٪ IC50 TP4 منجر به افزایش بیان ژن‌های القاکننده آپوپتوز (Bax، casp3 و p53) و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوز (Bcl2) در سلول‌های PC3 در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.05$) (شکل ۴). بیشترین تغییرات بیان ژن‌های فوق در گروه تیمار با دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر TP4 (۵۰٪ IC50) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴. ارزیابی تغییری بیان ژن‌های Bcl2، Bax، p53 و Caspases در سلول‌های PC3 پس از تیمار با (TP4) در غلظت‌های ۲۵٪ و ۵۰٪. داده‌ها با بیان ژن رفرنس GAPDH نرمال شدند و به عنوان می‌انگین تغییری برابر بیان (Fold change) \pm انحراف معیار (SD) ارائه شد. هر آزمایش در سه تکرار، با مجموع سه آزمایش مستقل ($n = 6$) انجام شد. گروه‌هایی که با حروف مختلف برچسب‌گذاری شده‌اند، تفاوت‌های معنی‌داری را در با هم نشان می‌دهند ($P < 0.05$). ستاره تفاوت معنی‌دار هر گروه را با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($P < 0.01$).

بحث و نتیجه‌گیری

تیلایا پسیدین ۴ یک پپتید ضد میکروبی با اثربخشی درمانی بالقوه در درمان سرطان است. این مطالعه به بررسی اثر و نحوه عملکرد مولکولی TP4 بر روی سلول‌های سرطان پروستات پرداخت. در این مطالعه نتایج نشان داد تیمار TP4 وابسته به دوز، رشد سلولی را در رده سلولی PC3 مهار کرد. مطالعه Ting و همکاران (۲۰۱۸) نیز اثرات سیتوتوکسیک تیمار TP4 بر روی سلول‌های سرطانی ریه A549 را گزارش کردند (26)، که با یافته‌های مطالعه حاضر همسو بود. علاوه بر این، مقدار شاخص انتخاب از ۲ فراتر رفت که نشان‌دهنده‌گر پذیرش بالای TP4 برای سلول‌های سرطانی است. مطالعات دیگر هم نشان داده که AMPها به دلیل بار منفی بالا در سطح سلولی بیرونی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های غیر سرطانی پستانداران، اختصاصی بودن بالایی را در مطالعات نشان دادند (23).

القای آپوپتوز از طریق استفاده از مواد طبیعی سیتوتوکسیک رویکرد محوری در درمان سرطان و توسعه داروهای جدید در نظر گرفته می‌شود (24). تیمار سلول‌های MCF-7 با ۲۵٪ و ۵۰٪ TP4 IC50 منجر به تنظیم مثبت ژن‌های پرو آپوپتوز Bax (P53، Caspas) و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوز (Bcl2) شد. علاوه بر این، طول دنباله‌های DNA در این گروه آزمایشی به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. در مقابل، ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو کاهش سطح درون سلولی محتوای ROS و MDA و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. بنابراین نشان داده شد که TP4 احتمالاً با القای تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در میتوکندری، زنده‌مانی سلول‌های PC3 را کاهش داد. این نتایج به نوبه خود باعث ایجاد آپوپتوز درونی با واسطه کاسپاز نیز شد. از طریق تجزیه و تحلیل Real-time PCR، مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با TP4 سلول‌های سرطان پروستات با برهم زدن سطوح Bax و Bcl-2 باعث شروع مسیر آپوپتوز شد. ژن Bax یک ژن القاگر آپوپتوز است و ثابت شده است که در آپوپتوز با واسطه p53 در سیستم‌های مختلف افزایش بیان می‌یابد (8). افزایش سطح بیان p53 ناشی از TP4 در سلول‌های PC3 نقش آن را در فعال کردن آپوپتوز میتوکندری نشان می‌دهد. این فعال سازی با اختلال در سطوح Bax و Bcl-2 تسهیل می‌شود که منجر به اختلال عملکرد میتوکندری و متعاقب آن فعال شدن کاسپاز-۳ می‌شود (26). کاسپاز-۳، پروتئینی از خانواده پروتئازها است و نقش مرکزی در توسعه آپوپتوز ایفا می‌کند و به عنوان یک جزء حیاتی در قطعه قطعه شدن DNA، تراکم کروماتین و سایر فرآیندهای آپوپتوز می‌باشد (25). در تایید یافته‌های این مطالعه، سوئو همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که TP4 باعث ایجاد هیپرپلازیاسیون میتوکندری و افزایش ROS میتوکندری در سلول‌های سارکوم سینوویال انسان شد. علاوه بر این، TP4 سطوح آنزیم آنتی‌اکسیدانی را کاهش داد و به طور بالقوه حساسیت سلولی را به آسیب ناشی از ROS در این سلول‌ها افزایش داد. مطالعه آنها همچنین نشان داد که درمان TP4 باعث شکستگی DNA و افزایش طول کامت‌ها در سلول‌های سرطانی رده U251 و U87MG شد (24).

سمیت سلولی ناشی از TP4 بسته به نوع سلول سرطانی، رونوشت و تنظیم ژن متفاوت است. برای مثال در مطالعه ایی که در سرطان سینه انجام شد مشخص گردید که در سلول‌های رده MDA-MB-231 و MCF7، تیمار TP4 می‌تواند سبب فعال شدن آنکوژن FOSB شود، در حالی که در سلول‌های MB453، عمدتاً شکل کوتاه شده آنکوژن FOSB یعنی FOSDB را القا کرد (27). بیان بیش از حد FOSB یا FOSDB منجر به مرگ سلولی در تمام سلول‌های سرطان سینه آزمایش شده شد و از بین رفتن FOSB سمیت سلولی ناشی از TP4 را کاهش داد (12). فعال سازی FOSB یا FOSDB ناشی از TP4 به سیگنال‌دهی Ca^{2+} و اختلال عملکرد میتوکندری متکی است که منجر به مرگ نکروز در سلول‌های سرطانی شد که نشان‌دهنده دخالت سیگنال‌دهی FOSB وابسته به Ca^{2+} در سمیت سلولی ناشی از TP4 است. علاوه بر این، TP4 از طریق فعال شدن مسیرهای بیرونی Fas/FasL و مسیرهای واسطه میتوکندری درونی، آپوپتوز را در رده سلولی استئوسارکوم القا کرد (14). پیش تیمار این سلول‌ها با مهارکننده کاسپاز-۸ (Z-IETD-FMK) یا مهارکننده کاسپاز-۹ (Z-LEHD-FMK) به طور قابل توجهی فعال شدن کاسپاز-۳ را کاهش داد و از آپوپتوز جلوگیری کرد (14). در سلول‌های سرطان ریه، مرگ نکروزه ناشی از TP4 به جای مرگ آپوپتوتیک مشاهده شد (26). این یافته‌ها نشان می‌دهد که TP4 مسیرهای سیتوتوکسیک متمایز را در انواع مختلف سرطان تحریک می‌کند.

*Su

*FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی مطالعه حاضر نتایج نشان داد که پپتید ضد میکروبی دریایی TP4 ممکن است بر اساس داده‌های آزمایشگاهی، مزایای درمانی در درمان سرطان پروستات انسان داشته باشد. بررسی نتایج مربوط به آسیب به DNA و ارزیابی بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز و نتایج استرس اکسیداتیو نشان داد که TP4 با تحریک استرس اکسیداتیو باعث تکه تکه شدن DNA و آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود. هرچند، مسیرهای دیگری که TP4 میتواند باعث مرگ سلول‌های سرطان پروستات انسان می‌گردد مورد بررسی قرار نگرفته و باید در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد. به هر حال برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر و استفاده بالینی از دستاوردهای مطالعات آزمایشگاهی اینچنینی، آزمون‌های درون تنی و بالینی ضروری به نظر می‌رسند.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات مقاومت ضد میکروبی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل جهت همکاری و فراهم کردن پپتید و سلول تشکر و قدردانی می‌شود

منابع

- Alafnan A, Hussain T, Rizvi SMD, Moin A, Alamri AJClimb. 2021. Prostate apoptotic induction and NFκB suppression by Dammarolic acid: mechanistic insight into onco-therapeutic action of an Aglycone Asiaticoside. *Current Issues in Molecular Biology*.43:932-40.
- Alipour M, Mofarrah R. 2022. Probiotics for treatment of helicobacter pylori infections and gastric cancer prevention. *Journal of Genetic Resources*.8:244-54.
- Aghamiri S, Zandsalimi F, Raei P, Abdollahifar M-A, Tan SC, Low TY. 2021. Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer. *Pharmacological Research*. ۱۷۱:۱۰۵۷۷۷
- Bilal M, Javaid A, Amjad F, Abou Youssif T, Afzal SJTO. 2022. An overview of prostate cancer (PCa) diagnosis: Potential role of miRNAs. *Translational Oncology*. 26:101542.
- Dasht BS, Sepehri H, Goliae B, Delphi L, Zamin E. 2013. Effect of pectic substances in induction of apoptosis in human prostate cell line DU145. *Journal of Molecular and Cellular Researches*. 26:186-199
- Divyashree M, Mani MK, Reddy D, Kumavath R, Ghosh P, Azevedo V. 2020. Clinical applications of antimicrobial peptides (AMPs): where do we stand now. *Protein and peptide letters*. 27:120-34.
- El-Magd MA, Khalifa SF, Alzahrani FAA, Badawy AA, El-Shetry ES, Dawood LM. 2018. Incensole acetate prevents beta-amyloid-induced neurotoxicity in human olfactory bulb neural stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.105:813-23.
- Farooq Z, Wani S, Rangunathrao VAB, Kochhar R, Anwar MJ. 2022. p53 Tumor Suppressor: Functional Regulation and Role in Gene Therapy. *p53-A Guardian of the Genome and Beyond* . IntechOpen
- Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Di Domizio A, Limonta PJC. 2020. Natural compounds in prostate cancer prevention and treatment: mechanisms of action and molecular targets. *Cells*. 9: 460.

10. Hazam PK, Chen J-YJAR. 2020. Therapeutic utility of the antimicrobial peptide Tilapia Piscidin 4 (TP4). *Aquaculture reports*. 17:100409.
11. Jotatsu Y, Shigemura K, Arbiser JL, Moriwaki M, Hirata Y, Maeda K. 2023. Intralesional Chemotherapy for Prostate Cancer: In Vivo Proof of Principle. *Oncology*. 101: 645–654
12. Kharazmi-khorassani J, Asoodeh A. 2022. The use of anticancer and cell-penetrating peptides in the treatment of cancer. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 35:183-97.
13. Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba KJP, genomics. 2005. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1* 5, SLCO1B1* 15 and SLCO1B1* 15+ C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 15:513-22.
14. Kuo H-M, Tseng C-C, Chen N-F, Tai M-H, Hung H-C, Feng C-W. 2018. MSP-4, an antimicrobial peptide, induces apoptosis via activation of extrinsic Fas/FasL-and intrinsic mitochondria-mediated pathways in one osteosarcoma cell line. *Marine drugs*. 16:8.
15. Lee K, Jeong JE, Kim IH, Kim KS, Ju BGJJoc. 2015. Cyclo (phenylalanine-proline) induces DNA damage in mammalian cells via reactive oxygen species. *Journal of cellular and molecular medicine* 19: 2851-2864
16. Lee C-C, Hsieh HJ, Hsieh C-H, Hwang D-FJT. 2014. Spine venom of crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) induces antiproliferation and apoptosis of human melanoma cells (A375. S2). *Toxicol*. 91:126-34.
17. Lin S-Y, Lai W-W, Ho C-C, Yu F-S, Chen G-W, Yang J-S. 2009. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Research*. 29:327-35.
18. Livak KJ, Schmittgen TDJm. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25:402-8.
19. Neshani A, Eidgahi MRA, Zare H, Ghazvini KJJRMDS. 2018. Extended-Spectrum antimicrobial activity of the Low cost produced Tilapia Piscidin 4 (TP4) marine antimicrobial peptide. *Journal of Research in Medical and Dental Science*. 6:327-34.
20. Pan C-Y, Tsai T-Y, Su B-C, Hui C-F, Chen J-YJPo. 2017. Study of the antimicrobial activity of tilapia piscidin 3 (TP3) and TP4 and their effects on immune functions in hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*). *PloS one*. 12:169678.
21. Rahamouz-Haghighi S, Mohsen-Pour N. 2023. Toxicity Assessment of *Euphorbia esula* L. Extracts on HCT116, SW480, HEK293 Cell Lines, *Artemia salina* Larvae, and Its Bactericidal Effects. *Journal of Genetic Resources*. 9:123-32.
22. Rashidi M, Seghatoleslam A, Namavari M, Amiri A, Fahmidehkar MA, Ramezani A. 2017. Selective cytotoxicity and apoptosis-induction of *Cyrtopodium scabrum* extract against digestive cancer cell lines. *International Journal of Cancer Management*. 10: 8633
23. Schweizer FJEjop. 2009. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European journal of pharmacology*. 625:190-4.
24. Su B-C, Pan C-Y, Chen J-YJC. 2019. Antimicrobial peptide TP4 induces ROS-mediated necrosis by triggering mitochondrial dysfunction in wild-type and mutant p53 glioblastoma cells. *Cancers*. 11: 171.
25. Su T-R, Tsai F-J, Lin J-J, Huang HH, Chiu C-C, Su J-H. 2019. Induction of apoptosis by 11-dehydrosinulariolide via mitochondrial dysregulation and ER stress pathways in human melanoma cells. *Marine Drugs*. 10:1883-98.
26. Ting C-H, Chen J-YJMD. 2018. Nile Tilapia derived TP4 shows broad cytotoxicity toward to non-small-cell lung cancer cells. *Marine Drugs*. 16: 506.

27. Ting C-H, Chen Y-C, Wu C-J, Chen J-YJO. 2016. Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 7:40329.
28. Ting C-H, Huang H-N, Huang T-C, Wu C-J, Chen J-YJB. 2014. The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS. *Biomaterials*. 35: 3627-3640.
29. Zhang G, Sunkara LTJP. 2014. Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals*. 7 :220-47.

Selective Cytotoxicity and Apoptotic Mechanisms of Tilapia Piscidin 4 (TP4) in Human Prostate Cancer Cells: Insights into ROS-Dependent Apoptosis Induction

Abstract

Background and objective: The use of antimicrobial peptides in cancer treatment is a new therapeutic approach that has gained attention in scientific research for the treatment of various types of cancer. This study aimed to investigate the cytotoxic effects of the antimicrobial peptide Tilapia piscidin 4 (TP4) and elucidate its apoptotic molecular mechanisms in the human prostate cancer cell line PC3.

Methods: PC3 cells were divided into three groups: untreated PC3 cells, treated cells with IC₅₀ 0.5 and IC₅₀ 0.25. After the treatment, oxidative stress indices, DNA damage measurement by Comet method and expression of genes related to apoptosis were evaluated.

Results: The results demonstrated the inhibitory effect of TP4 on PC3 cell proliferation after 24 hours (IC₅₀ = 15.50 µg/mL), while no cellular toxicity was observed in normal prostate cells (PrEC-31) at this concentration. The selectivity index (SI) exceeded 2, indicating TP4's high specificity for cancer cells. Treatment of PC3 cells with 25% and 50% of the IC₅₀ for TP4 induced apoptosis and DNA fragmentation in PC3 cells. This apoptosis induction was accompanied by increased expression of pro-apoptotic genes (Bax, P53, and Caspase 3) and decreased expression of the anti-apoptotic gene Bcl2, increased levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) content, as well as decreased activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes compared to the control group (P<0.05).

Conclusion: it can be concluded that TP4 can induce apoptosis in prostate cancer cells through an ROS-dependent pathway.

Keywords: Prostate cancer, Antimicrobial peptide, Apoptosis, Tilapia piscidin 4, DNA damage.