Archive of SID

Original Paper

Effect of recombinant *Herceptin* on the growth of breast cancer cells

Nafiseh Kiarostami (M.Sc), M.Sc in Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1113-0276

***Jafar Amani (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5155-4738

Abbas Ali Imani Fooladi (Ph.D), Professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. **jafar.amani@gmail.com** ORCID ID: 0001-7339-8257

Ali Mirhosseini (Ph.D), Assistant professor, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0001-7485-7777

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

Abstract

Background and Objective: Breast cancer is one of the most common types of cancer among women. HER-2 molecule as the receptor of tyrosine kinase from the family of epithermal growth factor is a major cause of cancer. The *Herceptin* protein molecule, which is an anti-HER-2 antibody, can play an important role in the diagnosis and treatment of breast cancer. This study was done to subcloning of *Herceptin* gene, expression in the prokaryotic system (*E.coli*) and produce *Herceptin* recombinant protein for use in the treatment of breast cancer.

Methods: In this descriptive – laboratory study, *Herceptin* gene from synthesized construct was isolated by enzyme digestion, and then subcloned to the expression vector pET28a. Subcloning of the gene was confirmed using PCR and enzyme digestion. After transferring the vector into *E.coli* BL21 DE3, expression of the recombinant *Herceptin* gene was induced by IPTG. The recombinant protein was evaluated by SDS-PAGE and purified with Ni-NTA column chromatography and finally verified by western blotting using anti-histidine antibody. The survival of cells adjacent to recombinant Hercaptin by MTT was investigated.

Results: Following the subcloning of the *Herceptin* gene, PCR and enzyme digestion, the 741 fragment of the *Herceptin* gene was confirmed. Confirmation of *Herceptin's* recombinant protein and its evaluation on SDS-PAGE gel about 27 kDa was done. The recombinant protein was also confirmed with anti-histidine tag. The purified protein adjacent to the SKBR3 cell line was able to block the growth of cancer cells.

Conclusion: Regarding the expersion of HER2 antigen on surface of breast cancer cells, *Herceptin* can act as antibody blocker and it arrests the growth of breast cancer cells.

Keywords: Breast cancer, Recombinant *Herceptin*, Her-2 antigen, Cancer cell

Received 16 Apr 2018 **Revised** 7 Jul 2018 **Accepted** 25 Jul 2018

Cite this article as: Nafiseh Kiarostami, Jafar Amani, Abbas Ali Imani Fooladi, Ali Mirhosseini. [Effect of recombinant *Herceptin* on the growth of breast cancer cells]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Summer; 21(2): 120-127. [Article in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقی

اثر هرسپتین نوترکیب بر رشد سلول‌های سرطانی پستان

نفیسه کیارستمی، کارشناس ارشد زیست شناسی - ژنتیک، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. ORCID ID: 0000-0003-1113-0276

*** دکتر جعفر امانی**، دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
ORCID ID: 0000-0002-5155-4738

دکتر عباسعلی ایمانی فولادی، استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
ORCID ID: 0000-0001-7339-8257

دکتر سیدعلی میرحسینی، استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.
ORCID ID: 0000-0001-7485-7777

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در میان زنان است . مولکول HER-2 به‌عنوان گیرنده تیروزین کینازی از خانواده گیرنده‌های رشد عامل اپیدرمی، عامل اصلی سرطان است. مولکول پروتئینی هرسپتین که یک آنتی‌بادی ضد HER-2 است؛ می‌تواند نقش مهمی در تشخیص و درمان سرطان پستان داشته باشد. این مطالعه به منظور ساب کلون کردن ژن هرسپتین و سپس بیان در سیستم پروکاریوتی (E.coli) و تولید هرسپتین نوترکیب به منظور استفاده در درمان سرطان پستان انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ژن هرسپتین از سازه سنتزی با روش هضم آنزیمی جدا و درون وکتور بیانی pET28a انتقال داده شد. زیر همسانه‌سازی ژن موردنظر با استفاده از PCR و هضم آنزمی تایید گردید. پس از انتقال وکتور نوترکیب به میزبان E.coli BL21 DE3 ، با استفاده از القاگر IPTG ژن نوترکیب هرسپتین بیان شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی و تخلیص با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل انجام شد و در نهایت توسط وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی ضدهیستیدین تایید شد. میزان کشندگی و زنده ماندن سلول‌ها در مجاورت با هرسپتین نوترکیب با روش MTT بررسی شد.*

یافته‌ها: *پس از ساب کلونینگ ژن هرسپتین، PCR و هضم آنزیمی، قطعه ۷۴۱ جفت بازی ژن هرسپتین را تایید کرد. بیان پروتئین نوترکیب هرسپتین و ارزیابی آن بر روی ژل SDS-PAGE اندازه حدود ۲۷ کیلودالتون را تایید کرد. پروتئین نوکیب با استفاده از آنتی‌هیستیدین نیز تایید شد. پروتئین خالص شده در مجاورت با لاین سلول SKBR3 توانایی متوقف کننده رشد سلول‌های سرطانی را داشت.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به این که آنتی‌ژن HER2 به وفور بر سطح سلول‌های سرطانی پستان بیان می‌شود؛ پروتئین هرسپتین می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌بادی بازدارنده عمل نموده و رشد سلول‌های سرطانی پستان را مهار کند.*

کلید واژه‌ها: *سرطان پستان ، هرسپتین نوترکیب ، آنتی ژن her-2 ، سلول سرطانی*

* نویسنده مسؤول : دکتر جعفر امانی ، پست الکترونیکی jafar.amani@gmail.com
نشانی: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، بعد از خیابان شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
انستیتو سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، تلفن و نمابر ۸۲۴۸۲۵۴۹-۰۲۱

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱/۲۷ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/٤/۱٦ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۵/۳

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در زنان است که ۳۳ درصد از موارد سرطان را شامل می‌شود و هر ساله باعث مرگ و میرهای فراوانی پس از سرطان ریه در بین زنان می گردد. علی‌رغم پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته؛ کماکان یکی از مهم‌ترین علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است (۱). اگرچه تصور می‌شود سرطان پستان یک بیماری، در جهان توسعه یافته است؛ تقریباً ۵۰درصد از موارد ابتلا به سرطان پستان و ۵۸درصد از مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد. این سرطان شایع‌ترین سرطان در زنان است که ۳۳ درصد از موارد سرطان را شامل می‌شود. به دلایل نامشخصی سن ابتلا به این نوع سرطان در ایران یک دهه کاهش یافته است. اگرچه تصور می‌شود سرطان پستان یک بیماری در جهان توسعه یافته است؛ تقریبا ۵۰ درصد از موارد ابتلا به سرطان پستان و ۵۸ درصد از مرگ و میرها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد (۲). این فرض وجود دارد که در این بیماری ارتباطی بین رژیم غذایی (فیتواستروژن پایین و دریافت الکل) و بروز بیماری وجود دارد. به‌علاوه میزان مصرف زیاد چربی

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

و گوشت هم به علت کلسترول بالا در بروز این بیماری نقش دارند. چون کلسترول به‌عنوان پیش‌ساز هورمون‌های استروژنی و دیگر هورمون‌های استروئیدی است. لذا تماس پستان با مقدار زیاد استروژن باعث تحریک گسترش سرطان می‌شود. همچنین مشاهده شده رژیم غذایی فیبردار باعث مهار جذب مجدد روده‌ای استروژن می‌شود. یکی از چالش‌های عمده در درمان سرطان پستان ناشی از این است که آن یک بیماری ناهمگون با حداقل پنج زیرگونه است. عوامل زیادی در افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه موثرند که قابل تغییر نیستند که می‌توان به جنسیت، عوامل فردی، تغییرات ژنتیکی، نوع بافت پستانی، سن شروع و پایان قاعدگی اشاره نمود. نشانه های توموری به‌طور وسیعی در مورد سرطان پستان نیز کاربرد دارند. یک نشانه توموری ایده‌آل سرطان پستان، بایستی برای پستان اختصاصی باشد و نیز باید آنقدر حساسیت کافی را داشته باشد تا بتواند وجود تومورهای کوچک را نیز برای تشخیص اولیه و یا برای غربالگری تشخیص دهد (۳). البته هیچ نشانه‌ای با ویژگی های بالا تا به حال کشف نشده؛ اما با این حال بعضی از نشانه ها برای تعیین عود مجدد بیماری بعد از درمان اولیه و یا برای پیگیری بیماری مفیدند. به‌طور کلی پنج نوع اصلی تومور مارکر وجود دارند که شامل: الف) آنزیم الکالین فسفو فسفاتاز و PSA؛ ب) رسپتور بافتی (GCC، ER و PR)؛ ج) آنتی‌ژن (CA125،CA19-9 و CEA)؛ د) آنکوژن‌ها (Ras و Myc) و ه) هورمون HCG (کلسیتونین و Food and Drug Administration: FDA) هستند. بعضی از این نشانه‌های توموری در کاربرد بالینی تایید شده، درحالی که بقیه آن‌ها در حد تحقیقات است. تعدادی زیادی از این نشانه ها برای استفاده بیماران مبتلا به سرطان پستان مشخص شده که عمدتاً شامل CA27.29 و CA15-3 ازخانواده موسین (MUC1)، پروتئین‌های انکوفتال شامل CEA (۴)، انکوپروتئین‌ها شامل C-myc P53 و c-erbB2(HER-2) (۵)، سیتوکراتین‌ها شامل آنتی‌ژن پلی‌پپتید بافتی TPA و آنتی‌ژن مخصوص پلی‌پپتید بافتی TPS، میزان سدیمانتاسیوناریتروس (۶)، ژن‌های UPA، PAI، PCNA، VEGF، BRCA1، BRCA2، CI و CBCadherinE گیرنده های استروژن و پروژسترون و ماماگلوبین هستند (۶). میزان ۲۵- ۲۰ درصد سرطان پستان جز HER2 مثبت هستند که نشان‌دهنده یک شکل تهاجمی است که منجر به کاهش بقا در مقایسه با دیگر انواع سرطان پستان می‌شود. HERجز خانواده گیرنده‌های عامل رشد اپیدرمال انسانی هستند که شامل رسپتورهای مرتبط با HER1، HER2، HER3 و HER4 هستند که خانواده HER نام دارند. این گیرنده به صورت همودایمر یا هترودایمر با سایر اعضا خانواده گیرنده عامل رشد اپیدرمی باعث انتقال پیام می‌شود. هترو دایمرشدن آن بستگی به لیگاند سایر اعضای خانواده EGFR دارد (۷). تکثیر و بیان بیش از حد HER2 در سلول‌های سرطان پستان با افزایش اندازه تومور، افزایش طول فاز s چرخه سلولی، آنیوپلوئیدی و کاهش بیان گیرنده‌های هورمون‌های استروژن و پروژسترون همراه است (۸). در ۳۰ تا ۵۲ درصد مبتلایان به این سرطان افزایش بیان گیرنده HER2 دیده می‌شود. در بین درمان‌های متداول سرطان‌ها، شیمی‌درمانی از موثرترین روش‌ها بوده است. با وجود تمام موفقیت‌های این روش و همگام بودن بسیاری از کشورها از جمله ایران در راستای استفاده از داروها و پروتکل‌های شیمی‌درمانی نوین و به روز مشکل عدم پاسخ به درمان در تعداد قابل توجهی از بیماران به چشم می‌خورد.

هرسپتین (Trastuzumab) از جمله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Humanized شده است که علیه محصول پروتوانکوژن HER2 عمل می‌کند. در واقع ناحیه CD در MAb 4D5 کاملاً Humanized شده و هرسپتین را به‌وجود آورده که علیه دومن خارج سلولی HER2 وارد عمل می‌شود. اتصال هرسپتین به دومین خارجی رسپتور تیروزین کیناز (RTK) منجر به داخلی شدن (Internalization) رسپتور و باعث مهار مسیر پیام رسانی PI3K می‌گردد (۹). در این مکانیسم با اتصال هرسپتین به HER2،کاهش فسفریلاسیون PTEN در اسیدآمینه تیروزین اتفاق می‌افتد و PTEN بیشتر در غشا قرار می‌گیرد. PTEN با فعالیت فسفاتازی باعث دفسفریلاسدن AKT شده و در نهایت مهار رشد و تقسیم سلولی را به‌دنبال دارد. در این صورت مهار سیکل سلولی وابسته به آنتی بادی (ADCC) را به علت پاسخ‌های ایمنی و فعال شدن سلول‌های NK و در نهایت لیز سلولی می‌توان مشاهده کرد (۱۰). همچنین هرسپتین قادر است از برش و تجزیه HER2 جلوگیری نموده و مانع تشکیل یک رسپتور ناقص متصل به غشاء (P95) و در عین حال فعال همیشگی گردد (۱۱). P95 فعالیت کینازی داشته و در تکثیر سلول نقش اساسی دارد. هرسپتین با مهار متالوپروتئازها مانع از برش و تجزیه HER2 می‌گردد (۱۲). علاوه بر مهار فعالیت HER2 و در نتیجه مهار تکثیر توموری، هرسپتین منجر به ایستایی و مرگ سلولی می‌شود (۱۰). در واقع هرسپتین با مهار Cyclin D1 و در نتیجه مهار Inhibitor cdk inhibitor P27 باعث آزاد شدن پروتئین P27 می‌گردد که نقش مهارکنندگی کمپلکس Cyclin E/CDK2 را دارد (۱۲). بنابراین سلول در G1 متوقف می‌شود (۱۳). همچنین هرسپتین با کاهش بیان VGFR باعث مهار رگ‌زایی و پیشرفت تومور می‌شود (۱۱). با توجه به این که هرسپتین به عنوان یک آنتی‌بادی علیه مولکول HER-2 می‌تواند در تشخیص و پیشگیری از سرطان پستان موثر باشد؛ لذا در این مطالعه با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب اقدام به همسانه‌سازی، بیان و تولید این پروتئین نوترکیب کردیم. این پروتئین به صورت نوترکیب در صورتی که ساختار صحیحی داشته باشد می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی پستان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

را بلاک کند.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) طی سال ۱۳۹۵ انجام شد.

تهیه سازه ژنی pET28a-herceptin: از سازه ژنی هرسپتین که داخل وکتور pUC18 قبلاً سنتز شده بود؛ استفاده گردید. پس از کشت باکتری حاوی سازه مورد نظر در محیط لوریا برتانی براث (LB broth) به صورت O/N در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، شیکینگ ثابت ۱۵۰ rpm و رسیدن جذب سلول‌ها به OD:۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، وکتور تخلیص شد و از محل سایت برشی آنزیم‌های HindIII و XhoI برش داده شد. سپس قطعه هرسپتین به داخل وکتور pET28a(+) الحاق (کلون) گردید. وکتور موردنظر برای انجام آزمایشات به داخل سلول مستعد میزبان‌های *E. coli* BL21 (DE3) و *E. Coli* DH5α تراریخت (ترانسفورم) شد. این تراریخت شدن توسط شوک حرارتی صورت گرفت. بدین صورت که ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش القا به صورت شوک حرارتی به سلول میزبان مستعد و سلول‌های میزبان تراریخت شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند و به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تایید همسانه سازی ژن: تعداد ۵ کلونی از کلون‌های رشدیافته بر روی محیط انتخابی LB آگار انتخاب شدند و به محیط LB براث حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منتقل شدند. پس از رسیدن جذب سلول‌ها به OD:۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، استخراج پلاسمید صورت پذیرفت. با استفاده از تکنیک‌های PCR، واکنش هضم آنزیمی و همچنین توسط پرایمرهای عمومی T7 اپراتور و ترمیناتور، همسان‌سازی ژن Herceptin درون وکتور pET28a(+) تایید شد.

بیان پروتئین نوترکیب Herceptin: پس از تایید کلون‌های اولیه حاوی ژن هرسپتین، ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی ژن نوترکیب هرسپتین به ۵ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی براث (LB broth) استریل حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه و به صورت O/N در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حرکت دورانی ۱۵۰ rpm کشت داده شد. با توجه به تحت کنترل بودن بیان ژن توسط اوپرون Lac در سویه میزبان BL21(DE3)، پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، از ماده القاگر مصنوعی IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) استفاده شد. سپس بیان از نقطه نظر IPTG، دما و زمان بهینه‌سازی گردید. نمونه‌ها قبل و بعد از القای IPTG همراه با نشانگر پروتئین الکتروفورز شدند و توسط ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد تحت جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر بررسی شد.

تخلیص پروتئین از ستون نیترو-نیتریلوتری استیک اسید (Ni-NTA): پس از بیان پروتئین هرسپتین در مقیاس بالا، تخلیص پروتئین تحت شرایط دناتوره و با استفاده از ستون Ni-NTA با کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد که در آن ذرات نیکل موجود در ستون کروماتوگرافی به دنباله هیستیدین پروتئین نوترکیب متصل شده و سبب جداسازی آن از محلول شد. نمونه‌های حاصل توسط ژل الکتروفورز ۱۲ درصد بررسی شدند.

تایید پروتئین نوترکیب توسط وسترن بلاتینگ: برای تایید پروتئین نوترکیب سلول های باکتری که به صورت O/N در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده بودند؛ به کمک بافر لیز شده و سپس به میزان مناسب از عصار سلولی القا شده و القا نشده حاصل با کمک SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز و تفکیک شدند. انتقال پروتئین ها از ژل پلی آکریل آمید به یک غشا نیتروسلولزی PVDF بااستفاده از بافر تریس/گلیسین همراه با ۲۰ درصد متانول صورت گرفت. به‌کمک محلول بلاکینگ حاوی ۵ درصد شیرخشک به صورت O/N کاغذ نیتروسلولز بلاک گردید. سپس ۳ بار شستشو توسط PBS-T صورت پذیرفت. سپس نمونه به مدت ۲-۱ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض اختصاصی ضدهیستیدین موشی کانژوگه با پروکسیداز با رقت ۱/۱۰۰۰۰ قرار گرفت. پس از ۳ بار شستشو کاملاً شبیه شستشوی مرحله قبل، با افزودن آنزیم سوبسترای کانژوگه با HRP (تریس ۵۰ میلی‌مولار، DAB، H2O2)، واکنش رنگ‌پذیری مربوط به هرسپتین صورت پذیرفت. در نهایت برای متوقف نمودن واکنش سوبسترا، کاغذ مربوطه با آب مقطر دی یونیزه شستشو داده شد.

تعیین غلظت پروتئین: برای تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول‌های به‌دست آمده حاصل از مراحل قبل از روش برادفوردو همچنین دستگاه نانودراپ شرکت Thermo استفاده شد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد برادفورد، ابتدا از غلظت‌های مختلف و معلوم محلول حاوی پروتئین آلبومین BSAاستاندارد استفاده شد. پس از تهیه هر یک از محلول‌های فوق، ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به‌کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و سپس با نرم‌فزار Microsoft Excel منحنی استاندارد رسم شد و با به‌دست آمدن معادله آن به‌منظور محاسبه میزان پروتئین در نمونه‌های مجهول مورداستفاده قرارگرفت.

بررسی عملکرد هرسپتین بر روی سلول‌های سرطانی پستان: تعداد کلی سلول (SKBR3) برابر 5×10^5 cell/ml محاسبه گردید. در میکروپلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰cell/well ریخته شد. رقت‌های مختلف پروتئین بر حسب میکرگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

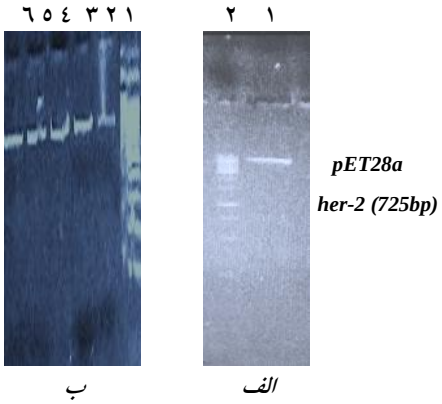
حاوی سلول اضافه شد. از هر رقت به سه چاهک حاوی سلول اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد انکوبه شد و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت مورد بررسی قرار گرفت. از محیط RPMI به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون در ساعتهای فوق به میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. غلظت نهایی رنگ معادل ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. به‌مدت ۶-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵ درصد انکوبه شد. پس از طی این زمان و به دنبال بررسی و تشکیل بلورهای بنفش رنگ با میکروسکوپ محلول رویی سلول‌ها را به آرامی جمع‌آوری کرده و میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول حلال کریستال (DMSO) اضافه کرده و با پیپت کردن، کریستال‌ها را حل کردیم. پس از ۲۰- ۱۰دقیقه میزان جذب OD را در طول ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر خواندیم و سیتوتوکسیسیتی را محاسبه نمودیم (۱۴).

$$\text{Cytotoxicity} = 1 - \frac{\text{mean absorbance of toxicant}}{\text{mean absorbance of negative contrtol}} \times 100$$

$$\text{Viability} = 100 - \text{Cytotoxicity (\%)}$$

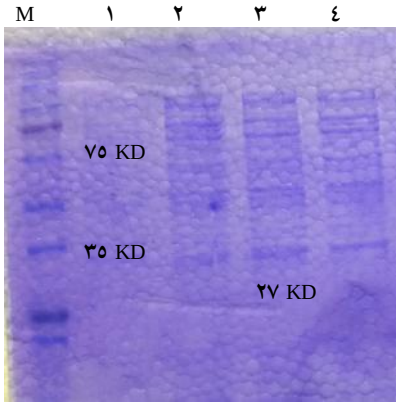
یافته‌ها

ژن هرسپتین که قبلاً به صورت سنتزی تهیه شده بود در وکتور وکتور بیانی pET28a کلون شد و به داخل باکتری *E.coli* strain BL21(DE3) انتقال داده شد. برای مشاهده پلاسمید و وکتور هضم آنزیمی شده مقدار ۲۰ میکرولیتر از هرکدام روی ژل آگارز برده شد که نتیجه آن در شکل یک مشاهده می‌شود.



شکل ۱ : الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید حاوی سازه ژنی و PCR بر روی ژل آگارز یک درصد
الف) ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۲: پلاسمید هضم شده؛ ب) ستون ۱: نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ bp)، ستون ۲، ۳، ٤، ٥ و ٦: PCR پلاسمیدهای نوترکیب

پس از کشت سلول‌ها و القاء با القاگر IPTG بیان ژن صورت گرفت و جداسازی پروتئین به روش دناتوره و تعیین نوع پروتئین از لحاظ محلول یا نامحلول بودن، انجام شد و نتیجه بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که وزن پروتئین نوترکیب به همراه pET28 حدود ۲۷ کیلو دالتون است؛ از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. نتایج حاصله از بهینه‌سازی بیان ژن نشان داد که بهترین بیان، در زمان ۱۵ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت یک میلی‌مولار IPTG صورت گرفته است (شکل ۲). به دلیل نیاز به پروتئین خالص دارای ساختار صحیح برای تشخیص، تخلیص پروتئین تحت شرایط دناتوره با شیب ایمیدازول ۴۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار صورت گرفت. نمونه‌های خروجی ستون جمع آوری و بررسی گردید (شکل ۳). برای تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی بادی His-tag استفاده شد که در شکل ۴ آمده است. در ستون شماره یک که مربوط به نمونه بعد از بیان است؛ یک باند در محدوده ۲۷ کیلودالتون برای پروتئین هرسپتین مشاهده می‌شود.



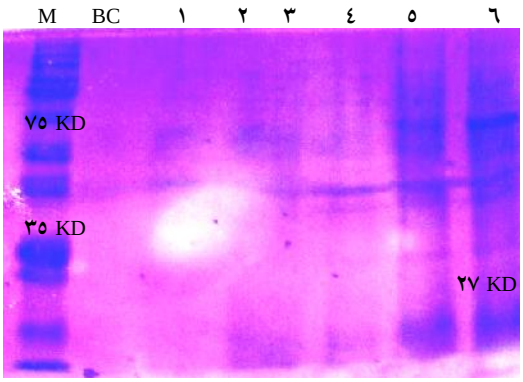
شکل ۲ : الکتروفورز بیان قطعه هرسپتین همراه با pET28 بر روی ژل آکریل آمید ۱۲/۵ درصد
ستون M) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۱) رسوب کشت باکتری BL21 (DE3) حاوی وکتور pET28a همراه ژن هرسپتین قبل از اضافه نمودن IPTG به عنوان کنترل، ستون ۲ تا ٤) رسوب کشت باکتری BL21 (DE3) حاوی وکتور pET28a همراه ژن هرسپتین پس از اضافه نمودن IPTG

میزان سمیت و کشندگی پروتئین‌های نوترکیب هرسپتین و مقاومت و بقا سلول‌های توموری بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با یکدیگر در رقت‌های متفاوت در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است. با توجه به نمودارها مشاهده می‌شود که پروتئین نوترکیب هرسپتین توانایی بلاک کردن سلول‌های توموری را دارد و می‌تواند از رشد آنها جلوگیری کند.

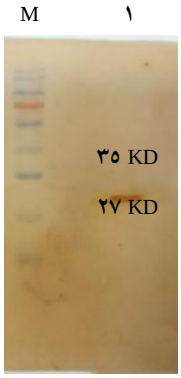
www.SID.ir

Archive of SID

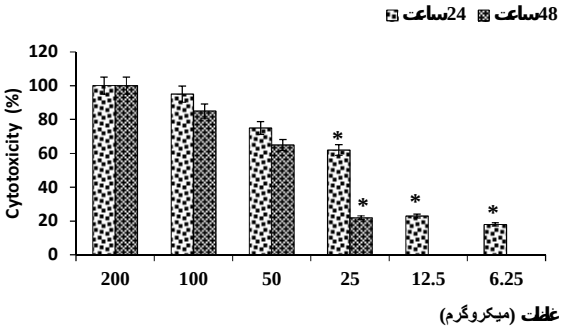
Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019



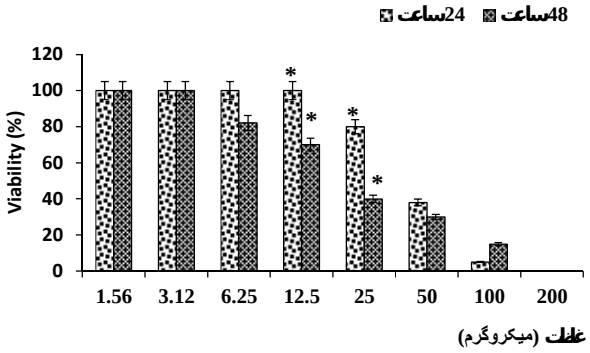
شکل ۳ : تخلیص پروتئین هرسپتین به کمک ستون Ni-NTA ستون M) نشانگر اندازه پروتئین، BC: نمونه قبل از بردن بر روی ستون Ni-NTA، ستون ۱ (Flow)، نمونه خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون ۲، ۳) نمونه‌های خروجی ستون پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده، ستون ٤ و ٥) نمونه خروجی ستون پس از فروشویی با بافر Elution، ستون ٦) نمونه خروجی ستون پس از شستشو با مس بافر



شکل ٤ : وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب ستون M) نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱) نمونه سوپ سلولی بعد از بیان پروتئین نوترکیب



نمودار ۱ : میزان سمیت و کشندگی پروتئین نوترکیب هرسپتین بعد از مجاورت ۲٤ و ٤۸ ساعت با سلول‌های توموری (P<۰/۰٥)



نمودار ۲ : میزان مقاومت و بقای سلول‌های توموری بعد از مجاورت ۲٤ و ٤۸ ساعت با پروتئین نوترکیب هرسپتین (P<۰/۰٥)

بحث

در این مطالعه ژن هرسپتین در داخل وکتور pET28a کلون و بیان شد و پس از تخلیص در مجاورت سلول‌های توموری سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از MTT و بقا نشان داد که هرسپتین نوترکیب دارای فولد و ساختار صحیح است که توانسته است از رشد سلول‌های سرطانی پستان ممانعت به‌عمل آورد.

از میان سرطان‌ها، شیوع سرطان پستان در اکثر کشورهای پیشرفته در حال توسعه است. تشخیص و شروع به درمان سریع در مراحل اولیه این بیماری، از عوامل موثر در بهبود بیماران مبتلا به سرطان پستان است (۱٥). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، پروتئین‌هایی هستند که در درمان هدف‌دار به‌طور چشمگیری مورد استفاده قرار گرفته و گیرنده‌های عوامل رشد و مسیرهای سیگنال‌دهی آنها را هدف قرار می‌دهند (۱۶). فناوری تولید آنتی‌بادی مونوکلونال سبب تولید آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین علیه گیرنده HER2 در سرطان پستان شده است و به عنوان یک آنتی‌بادی در ایمونوتراپی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷). یکی از روش‌های مکمل در درمان سرطان، ایمونوتراپی یا استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال است که به‌صورت همراه با شیمی‌درمانی استفاده می‌شود. این روش درمانی بر اساس وجود آنتی ژن در سطح سلول‌های سرطانی و آنتی‌کور علیه آن استوار است. در این روش آنتی‌ژن‌هایی که خاص سلول‌های سرطانی هستند؛ انتخاب می‌شوند و آنتی‌کور علیه آن ساخته می‌شود (۱۸). با کمک آنتی‌کور روند رشد سلول متوقف شده و سلول از حالت سرطانی بودن خارج می‌شود. تا به‌حال آنتی‌ژن‌های بیان شده زیادی توسط سلول‌های سرطانی شناخته شده که از مهم‌ترین آنها آنتی‌ژن HER2 است. HER2 از آن دسته آنتی‌ژن‌های تومور است که در سطح سلول‌های سالم هم وجود دارد؛ ولی در سلول‌های سرطانی به مقدار خیلی زیاد بیان می‌شود (۱۹).

در مطالعه‌ای با انجام یک سال درمان با هرسپتین (ترازتوزومب) پس از شیمی‌درمانی کمکی بهبود قابل توجهی از بیماری در میان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

زنان مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت مشاهده گردید (۲۰). مطالعات انجام شده در زمینه هرسپتین و مولکول HER-2 نشان می‌دهد که این دو مولکول در تشخیص به موقع و پیشگیری از پیشرفت سرطان نقش مهمی دارند. در مطالعه ای نتایج ترکیبی از دو آزمایش شیمی‌درمانی کمکی با یا بدون ترازتوزوماب همزمان در زنان مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت نشان داده شد (۲۱). Goldenberg در سال ۱۹۹۹ آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی هرسپتین را با استفاده از تکنیک DNA نوترکیب تولید و اثرات آن را روی ۴۶۹ زن مبتلا به سرطان پستان مطالعه نمود و ۲۶ درصد نتایج رضایت‌بخش بود (۱۳). نتایج مطالعه Campiglio و همکاران نشان داد درمان ترکیبی با هدف قرار دادن EGFR و ERBB-2 ممکن است در مهار کارآمد رشد تومور در آن دسته از بیماران مبتلا به سرطان پستان که تومور در هر دو گیرنده آنها بیان شده؛ موثر باشد (۲۲). کاظمی و همکاران با طراحی و بیان آنتی‌ژن نوترکیب HER2 توانستند آن را به عنوان یک عامل تشخیصی مهم در سرطان پستان به کار ببرند (۲۳). آنتی‌بادی هرسپتین علیه آنتی‌ژن HER2 ساخته شده و در درمان سرطان‌های پستان که از نوع بیان کننده زیاد این آنتی‌ژن هستند؛ به‌کار برده می‌شود (۲۴و۲۵).

لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر، بخش Fab آنتی‌بادی HER2 به‌صورت نوترکیب تولید شد که کارایی آن با آنتی‌بادی مونوکلونال تقریباً یکسان است.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که آنتی‌ژن HER2 به وفور بر سطح سلول‌های سرطانی پستان بیان می‌شود؛ پروتئین هرسپتین می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌بادی بازدارنده عمل نموده و رشد سلول‌های سرطانی پستان را مهار کند. با توجه به مطالعات انجام شده و تحقیق حاضر این آنتی‌بادی می‌تواند به عنوان یک داروی نوترکیب در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان نامه (شماره ایران داک ۲۴۸۳۶۹۸) خانم نفیسه کیارستمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان بود. همچنین نتیجه طرح مصوب (شماره ۰۰۰۸۲۰-۰۷-۹۵) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله بدون دریافت بودجه بود. بدین‌وسیله از مسؤولین به خاطر تهیه امکانات و آزمایشگاه قدردانی می‌شود.

References

1. Thongsuksai P, Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care: a study in Thai women. Med Care. 2000 Jan; 38(1): 108-14.

2. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol. 2008 Aug; 9(8): 730-56. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70179-7

3. Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. Cancer Treat Rev. 2000 Apr; 26(2): 91-102. doi: 10.1053/ctrv.1999.0151

4. Hayes DF. Tumor markers for breast cancer. Current utilities and future prospects. Hematol Oncol Clin North Am. 1994 Jun; 8(3): 485-506.

5. Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. Int J Biol Markers. 2000 Oct-Dec; 15(4): 330-33.

6. Ebeling FG, Stieber P, Untch M, Nagel D, Konecny GE, Schmitt UM, et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. Br J Cancer. 2002 Apr; 86(8): 1217-22. doi: 10.1038/sj.bjc.6600248

7. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. J Pathol. 2001 Nov; 195(4): 422-28. doi: 10.1002/path.971

8. Ludovini V, Gori S, Colozza M, Pistola L, Rulli E, Floriani I, et al. Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. Ann Oncol. 2008 May; 19(5): 883-90. doi: 10.1093/annonc/mdm585

9. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. Cancer Res. 2002 Jul; 62(14): 4132-41.

10. Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. Exp Hematol. 1999 Oct; 27(10): 1533-41.

11. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. Ann Oncol. 2007 Jun; 18(6): 977-84. doi: 10.1093/annonc/mdl475

12. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res. 1998 Jul; 58(13): 2825-31.

13. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. Clin Ther. 1999 Feb; 21(2): 309-18. doi: 10.1016/S0149-2918(00)88288-0

14. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. Methods Mol Biol. 2015; 1250: 333-48. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.

15. Davoli A, Hocevar BA, Brown TL. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Mar; 65(4): 611-23. doi: 10.1007/s00280-009-1208-1

16. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. Nat Med. 2001 May; 7(5): 548-52. doi: 10.1038/87872

17. Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? Clin Chem. 2006 Mar; 52(3): 345-51. doi: 10.1373/clinchem.2005.059832

18. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression

www.SID.ir

Archive of SID

in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. Int J Cancer. 1991 Aug; 49(1): 44-49.

19. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. Cancer Invest. 2001; 19(5): 554-68.

20. Widakowich C, Dinh P, de Azambuja E, Awada A, Piccart-Gebhart M. HER-2 positive breast cancer: what else beyond trastuzumab-based therapy? Anticancer Agents Med Chem. 2008; 8(5): 488-96.doi: 10.2174/187152008784533062

21. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med. 2005 Oct; 353(16): 1673-84. doi: 10.1056/NEJMoa052122

22. Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Viganò L, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. J Cell Physiol. 2004 Feb; 198(2): 259-68. doi: 10.1002/jcp.10411

23. Kazemi M, Amani J, Salmanian A H, Forghanifard MM, Aghamollaei H. [Design and expression of recombinant HER-2 antigen as a marker for detection of breast cancer]. Pathobiol Res. 2015; 17(4): 88-99. [Article in Persian]

24. Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascón P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. Adv Exp Med Biol. 2003; 532: 253-68.

25. Sun Y, Feng X, Qu J, Han W, Liu Z, Li X, et al. Expression and Characterization of the Extracellular Domain of Human HER2 from Escherichia Coli, and Production of Polyclonal Antibodies Against the Recombinant Proteins. Appl Biochem Biotechnol. 2015 Jun; 176(4): 1029-43. doi: 10.1007/s12010-015-1627-x

Downloaded from goums.ac.ir at 9:01 +0430 on Wednesday July 17th 2019

www.SID.ir