IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
سال ۱۴۰۳، دوره ۸، پیاپی ۱۸، صفحه ۴۱-۳۲

مقاله پژوهشی

طراحی سازه بیانی حاوی ژن دیس اینتگرین شناسایی‌شده از ترانسکریپتوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس و بررسی عملکرد آن در مدل برون تنی

سحر ابوالقاسمی[۱،۲]، مهدی بهدانی[۱]، فاطمه کاظمی لمعه‌دشت*[۱]

۱. آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: ۱۴ فروردین ۱۴۰۳ پذیرش: ۷ خرداد ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: چسبندگی سلول نقش مهمی در تهاجم سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند. دیس‌اینتگرین‌ها ابزار درمانی مناسبی برای سرطان محسوب می‌گردند. هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن دیس‌اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در میزبان باکتریایی و بررسی عملکرد آن در مدل برون‌تنی می‌باشد.

روش‌ها: در ابتدا ساختارهای اول، دوم و سوم پروتئین دیس اینتگرین با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. سپس ژن سنتز و در وکتور pET-22b کلون شد. سازه بدست‌آمده به میزبان باکتری اشریشیا کلای BL-21 ترانسفورم شد. بیان پروتئین توسط نیم میلی مولار ایزوپروپیل–بتا–D–تیوگالاکتوپیرانوسید القا شد. بیان با استفاده از ژل سدیم دودسیل سولفات–پلی آکریل آمید و وسترن بلات بررسی و تایید شد. پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل در شرایط دناتوره خالص‌سازی شد. پس از خالص‌سازی، پروتئین با حذف تدریجی اوره از طریق دیالیز دوباره تا شد. پس از بیان پروتئین و خالص سازی، اثر مهاری دیس اینتگرین بر بقا و مهاجرت رده‌های سلولی HUVEC به ترتیب با استفاده از روش MTT و Transwell مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل ساختاری نشان داد که ساختار پیش‌بینی‌شده دیس‌اینتگرین ویژگی‌های معمولی را نشان می‌دهد و با الگوهای ساختاری مورد انتظار مشاهده‌شده در پروتئین‌های دیس‌اینتگرین مطابقت دارد. بالاترین سطح بیان پروتئین با غلظت ایزوپروپیل–بتا–D–تیوگالاکتوپیرانوسید ۰/۵ میلی مولار و انکوباسیون ۵ ساعته مشاهده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده تقریباً ۱۲ کیلو دالتون بود. دیس اینتگرین رشد سلول های HUVEC را با IC۵۰ ۳۷ میکروگرم در میلی لیتر پس از یک دوره انکوباسیون ۴۸ ساعته مهار کرد. علاوه بر این، دیس‌اینتگرین خالص شده، مهاجرت ۷۰ درصد از سلول‌های HUVEC را به سمت منبع فاکتور رشد اندوتلیای عروقی، در مقایسه با گروه کنترل بدون دیس اینتگرین، مهار کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از پتانسیل دیس‌اینتگرین در مهار رشد و مهاجرت سلولهای اندوتلیال انسان می باشد.

واژه‌های کلیدی: ترانسکریپتوم، دیس‌اینتگرین ، عقرب همیسکورپیوس لپتوروس

مقدمه

در سال‌های اخیر، گزارشات متعددی درخصوص خواص انعقادی، ضدتوموری و ضدسرطانی سم‌های زیستی ارائه‌شده است [۱]. زهر جانوران سمی مخلوطی پیچیده از آنزیم‌ها، پپتیدها، کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم با فعالیت‌های بیولوژیکی و شیمیایی خاص است [۲]. به‌طورمثال، ترکیباتی از زهر مارها می‌تواند در درمان سرطان، آرتریت، ترومبوز، مالتیپل اسکلروزی، درد، اختلالات عصبی–عضلانی، خون و اختلالات قلبی و عروقی، عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی، مورد استفاده قرار گیرد. سم مار شامل هموتوکسین، کاردیوتوکسین، سایتوتوکسین، نوروتوکسین، فاکتورهای رشد عصبی، کاتیون‌های معدنی مانند (روی، کلسیم، پتاسیم، سدیم و منیزیم)، فسفولیپاز A2 ، سم سلول‌ها

* نویسندگان مسئول مکاتبات: fa_kazemi@pasteur.ac.ir, fatemeh1044@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-5832-1822)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

(CT1 , CT2 , CT3)، کروتوکسین، ال آمینو اسید اکسیدازها، لکتین‌ها، متالوپروتئین‌ها، دیس‌اینتگرین‌ها، و هیالورونیدازها می‌باشد [۳]. در خانواده اسکورپیونیده[1] عقربی با نام علمی همیسکورپیوس لپتوروس[2] وجود دارد که سمی کشنده دارد [۴]. دیس‌اینتگرین‌ها[3] به اینتگرین[4] روی سطح سلول متصل می‌شوند و تعداد زیادی از عملکردهای زیستی سلول را بلاک می‌کنند. این پروتئین‌ها به‌طورعمده در زهر جانوران سمی بویژه زهر مار خانواده ویپرا[5]و کروتالیدا[6] یافت می‌شوند [۵]. ویژگی دیس‌اینتگرین به موتیف[7] تری‌پپتیدی واقع در حلقه بستگی دارد که به وسیله جفت باز سیستئین تشکیل می‌شود. اکثر دیس‌اینتگرین‌ها یک تری‌پپتید موتیف آرژنین-گلایسین-آسپارتیک اسید هستند که به اینتگرین αIIbβ3 سطح پلاکت متصل می‌شوند [۶]. بعضی از دیس‌اینتگرین‌ها قادر هستند به اینتگرین αvβ3 و αvβ5 روی سطح سلول بعضی از سلول‌های توموری متصل شوند و مهاجرت سلولی و متاستاز را در انواع سلول‌های توموری مانند ریه و پستان و استخوان مهار کنند [۷]. گزارش شده است دیس‌اینتگرین نوترکیب که به گیرنده اینتگرین αvβ3 و یا به αvβ5 متصل می‌شود خواص ضد رگزایی دارد [۸]. اولین دیس‌اینتگرین شناخته شده زهر تریگرامین[8] از زهر تریمرسروس گرامینوس[9] است که به عنوان یک مهارکننده رقابتی اتصال فیبرینوژن به اینتگرین αvβ3 پلاکت (که توسط آدنوزین دی فسفات فعال می‌شود) عمل می‌کند [۸]. پس از این تعداد دیگری از دیس‌اینتگرین‌ها از زهر مارهای مختلف دیگر جدا شد [۹]. سانتروانت[10] و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که دیس‌اینتگرین نوترکیب کلون شده از زهر مار کروتالوس ادامانتوس[11] که حاوی موتیف آرژنین-گلایسین-آسپارتیک اسید است دارای اثر ضدتجمع پلاکتی قوی می‌باشد [۱۰]. اولین دیس‌اینتگرین جداشده از زهر عقرب بوتوس اسیتانوس تونتانوس[12] قادر است اینتگرین‌های α1β1 و αvβ3 را شناسایی کند [۱۱]. در این مطالعه ساختارهای اول و دوم و سوم دیس‌اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم غده زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس[13] با کمک بیوانفورماتیک شناسایی شد. ژن دیس اینتگرین درون میزبان باکتریایی کلون و بیان گردید و عملکرد آن در مدل برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Scorpionidae
[2] *Hemiscorpius lepturus*
[3] Disintegrin
[4] Integrin
5 Vipera
6 Crotalidae
[7] Motif
[8] Trigramin
[9] *Trimeresurus gramineus*
[10] Suntravat
[11] *Crotalus adamanteus*
[12] *Buthus occitanus tunetanus*

مواد و روش‌ها

مواد

رده سلولی HUVEC (NCBI code: C554) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. محیط کشت DMEM[14] و سرم جنین گاوی از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین/استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد. معرف MTT (۳ و ۴ و ۵ دی متیل تیازول -۲ یل -۲و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) از شرکت سیگما خریداری شد.

بررسی ساختارهای اول و دوم و سوم

دیس‌اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس[15] از مطالعه ترانسکریپتوم غده زهر عقرب شناسایی گردید [۱۲]. ابتدا یک همترازی بین توالی دومین دیس‌اینتگرین شناسایی شده با سایر دیس‌اینتگرین‌ها انجام گرفت. سپس پارامترهای مختلف ساختار اول دیس اینتگرین مانند وزن مولکولی، ترکیب اسیدآمینه‌ای، نقطه ایزوالکتریک، نیمه‌عمر و پایداری پروتئین مورد بررسی قرار گرفت [۱۳]. ساختار دوم پروتئین با کمک (PSIPRED)[16] مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. ساختار سه بعدی و عملکردی بودن پروتئین با کمک سرور آنلاین SWISS MODEL مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت ساختار پیش بینی شده با کمک) (ProSA-web) مورد بررسی قرار گرفت [۱۵].

سنتز ژن

توالی نوکلئوتیدی دیس اینتگرین عقرب درون وکتور pET-22b بین آنزیم‌های محدودالاثر NdeIو XhoI توسط

[13] *Hemiscorpius lepturus*
[14] Dulbecco's Modified Eagle Medium
[15] *Hemiscorpius lepturus*
[16] PSI-blast based secondary structure PREDiction

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

شرکت ژن ری[17] کانادا سنتز گردید. توالی متیونین و برچسب هیستیدینی به‌ترتیب در انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی سازه نهایی قرار گرفت. همچنین به‌منظور بیان در میزبان بیانی، بهینه‌سازی کدون توسط شرکت سازنده صورت گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین

سازه سنتز شده به درون میزبان بیانی اشریشیا کلای[18] BL-21 (DE3) با کمک شوک حرارتی و کلرید کلسیم ترانسفورم گردید. به‌منظور بیان پروتئین، یک تک کلون ترانسفورم‌شده از روی پلیت برداشته شد و به درون محیط کشت لوریا براث[19] مایع (۵ میلی‌لیتر) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح گردید و تا رسیدن به فاز لگاریتمی ($OD_{۶۰۰}$ ~۰/۶) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ انکوبه گردید. سپس بیان پروتئین با افزودن ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید نیم میلی‌مولار و انکوباسیون به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد القا گردید. بیان با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات ۱۵ درصد و وسترن‌بلات با آنتی بادی علیه برچسب هیستیدینی کونژوگه با پراکسیداز (رقت ۱:۵۰۰) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور تخلیص پروتئین، بیان با شرایط ذکر شده در حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر صورت گرفت. رسوب باکتری‌ها با کمک سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری گردید. سپس بافر لیزکننده (نمک سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، تریتون ایکس ۱۰۰ با غلظت ۰/۱ درصد، تریس-اسید ۵۰ میلی‌مولار) به رسوب باکتری‌ها اضافه گردید و برای ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه پالس و ۳۰ ثانیه استراحت) سونیکه گردید. سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی به‌مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و انکلیوژن بادیها[20] با بافر شستشو حاوی اوره ۶ مولار، شستشو داده شد و دوباره با همان دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل طبق روش شرکت سازنده صورت گرفت. برای با آرایی مجدد[21] پروتئین دناتوره‌شده از روش حذف گرادیانتی اوره با کمک دیالیز استفاده گردید. بررسی پروتئین تخلیص‌شده با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات و وسترن‌بلات انجام گرفت. سپس به‌منظور حذف لیپوپلی‌ساکارید باقیمانده در محلول پروتئین، از روش شستشو با ترایتون X-۱۱۴[22] استفاده گردید. محلول پروتئینی با ترایتون X-۱۱۴ (۱ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی سانتریفیوژ گردید.

بررسی سمیت سلولی

به‌منظور بررسی اثر دیس‌اینتگرین بر روی بقای رده‌ی سلولی HUVEC[23] از روش MTT Assay[24] استفاده شد. در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حدود ۱۰۴ سلول اضافه گردید. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دارای دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM به‌همراه غلظت‌های مختلف دیس اینتگرین (۱۰۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. از بافر فسفات به‌عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت برای دو زمان متفاوت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت به‌مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. سپس جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر (طول موج ۶۳۰ نانومتر به‌عنوان رفرنس درنظر گرفته شد) قرائت گردید. این تست به‌صورت سه بار تکرار انجام گرفت و غلظتی از دارو که قادر به مهار تقسیم سلولی به‌میزان ۵۰ درصد بود ($IC_{۵۰}$) بدست آمد. درصد مهار رشد با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد مهار = ۱- میزان جذب چاهک‌ها در گروه تست/میزان جذب چاهکها در گروه کنترل × ۱۰۰

بررسی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال

اثر مهاری دیس اینتگرین بر روی مهاجرت سلول‌های HUVEC با روش Transwell assay مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها (۵۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر) در محیط کشت به‌همراه غلظت ۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر

[17] Generay
[18] *Escherichia coli*
[19] Luria Broth
[20] Inclusion bodies
[21] Refolding
[22] Triton X-114
[23] Human umbilical vein endothelial cells
[24] 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

(غلظت IC_{50} بدست‌آمده از نتایج MTT) از دیس‌اینتگرین در قسمت بالایی پلیت اضافه گردید. همچنین در قسمت پایینی پلیت FBS[25] ده درصد اضافه گردید. از بافر فسفات به‌عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس سلول‌های مهاجرت کرده به قسمت پایینی پلیت با ترپسینه‌کردن[26] مورد شمارش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزارپریسم نسخه ۹ برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون تی[27] مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار (در هر گروه) ± خطای معیار بیان شد.

یافته‌ها

آنالیز ساختارها

توالی ناحیه دیس‌اینتگرین و نتایج همترازی چندگانه در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج همترازی بین توالی دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس و سایر دیس‌اینتگرین‌ها در گونه‌های مختلف عقرب نشان داد که حدودا ۴۰ الی ۷۰ درصد مشابهت بین توالی‌ها وجود دارد. بعد از افزودن متیونین و توالی هیس به ابتدا و انتهای ژن بررسی توالی نشان داد که ژن دیس‌اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس دارای ۲۶۱ نوکلئوتید و ۸۷ اسیدآمینه می‌باشد. بررسی ساختار اول پروتئین نشان داد که پروتئین دیس‌اینتگرین دارای وزن مولکولی پیش‌بینی‌شده حدود ۹۵۰۸/۵۱ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۵/۸۰ و دارای نیمه‌عمر حدود ۱۰ ساعت در میزبان اشریشیاکلای، ۲۰ ساعت در مخمر و ۳۰ ساعت در شرایط برون‌تنی و شاخص آلیفاتیک ۲۸/۰۵ می‌باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین نشان داد پروتئین دارای دو ساختار مارپیچ آلفا و سه‌صفحه بتا می‌باشند (شکل ۲). بررسی ساختار سوم پیش‌بینی‌شده (شکل ۳ الف) نیز نشان داد که ۹۶/۱۵ درصد از اسید آمینه ها در ناحیه مطلوب، ۲/۸۶ درصد در ناحیه مجاز و صفر درصد در ناحیه غیر مجاز بودند (شکل ۳ب). همچنین نتایج آنالیز ساختار سه‌بعدی نشان داد که ساختار سه‌بعدی پروتئین در محدوده نرمال (محدوده‌ای که ساختار سایر پروتئین‌های موجود در طبیعت با روش کریستالوگرافی و NMR مشخص گردیده است) و دارای Z-score -4.03 می‌باشد (شکل ۳ج).

بیان و تخلیص پروتئین

در شکل ۴ سازه طراحی‌شده به‌منظور سنتز درون وکتور pET-22b نشان داده شده است. نتایج بیان نشان داد که بهترین بیان پروتئین بعد از انکوباسیون ۵ ساعته و ایزوپروپیل بتا–دی–تیوگالاکتوپیرانوزید نیم میلی‌مولار صورت گرفته است (شکل ۵الف). نتایج تخلیص پروتئین نیز حضور باند پروتئینی تقریبی ۱۲ کیلودالتون را نشان داد (شکل ۵ب). نتایج وسترن بلات نیز تاییدکننده حضور برچسب هیستیدینی در پروتئین بیان شده بود (شکل ۵ج).

بررسی سمیت سلولی

نتایج سمیت سلولی نشان داد که با افزایش غلظت دیس‌اینتگرین، تعداد سلول‌های زنده اندوتلیال کاهش پیدا کرد. IC_{50} برای دیس‌اینتگرین به ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون بدست آمد (نمودار ۱الف و ۱ب).

مهاجرت سلولی

نتایج تست مهاجرت سلولی نشان داد که دیس اینتگرین اثر مهاری بر روی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال انسان به سمت فاکتور رشد دارد. دیس‌اینتگرین در غلظت ۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون توانسته بود از مهاجرت ۷۰ درصد سلول‌های اندوتلیال به قسمت پایینی پلیت (که حاوی سرم جنین گاوی و فاکتورهای رشد می‌باشد) جلوگیری کرد. از بافر فسفات به‌عنوان کنترل استفاده گردید (نمودار ۱ج).

بحث

باتوجه به اثرات مهاری دیس‌اینتگرین روی سلول‌های سرطانی به‌نظر می‌رسد که این پروتئین ابزار بسیار مفیدی در فارماکولوژی و توسعه داروهای جدید ضدسرطان باشد [۱۶].

[25] Fetal bovine serum
[26] Trypsinization
[27] T-test

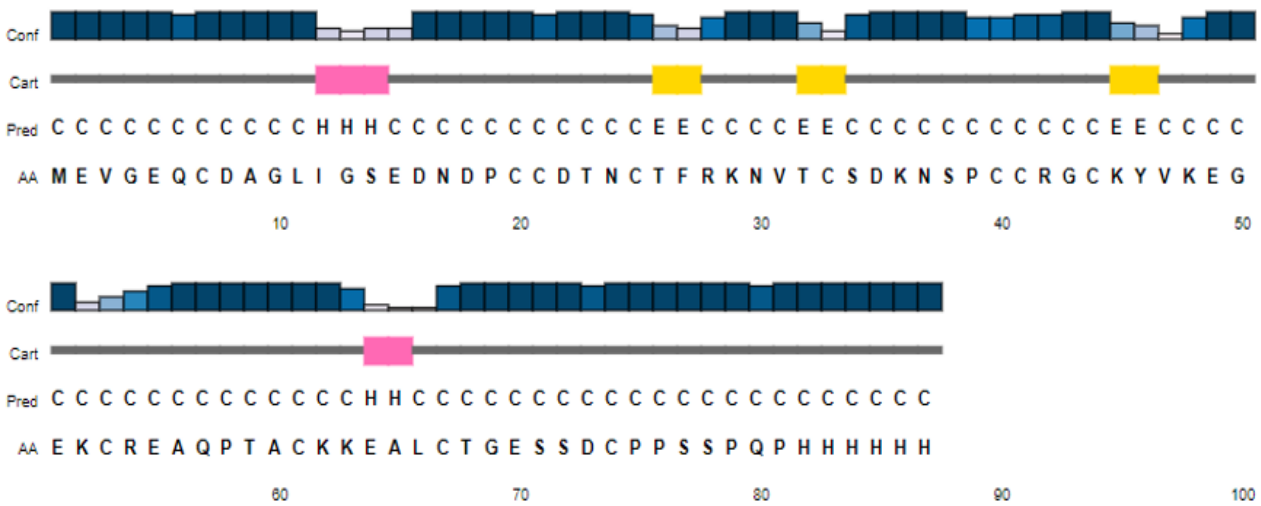
[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

```
ATGGAAGTTGGGGAACAGTGTGATGCTGGCTTAATTGGGAGTGAAGATAATGACCCATGTTGTGATACAAACTGCACCTT
TAGAAAAAATGTCACATGCAGTGACAAGAATTCTCCTTGTTGCCGTGGATGCAAATACGTAAAGGAAGGTGAAAAATGCA
GAGAGGCCCAGCCAACAGCATGTAAAAAGGAGGCACTTTGTACTGGGGAGTCATCTGATTGCCCTCCTTCTTCACCTCAG
CCT
XP_023218512.1      EIGEECDCGSRESCSLLDPCCNPPGT---------NYECNLKEEMSCSFREGKCCKEDCT      51
XP_023243347.1      ---ETCDCGYDGK-ECSDKCCYPRDVKPYKLANPNAERCTLRPGAHCSPSQGPCCLPSCN      56
AMO02515.1          EEGEQCDCGSIEECLQSDPCCDP-------------ITCKLRVEAECS--TGPCCE-NCK      44
XP_037602285.1      EEGEECDPGLL-H-LNNDRCCSA--------------DCKFKRNAQCSDRNSPCCI-NCV      43
HemiDis             EVGEQCDAGLIGS-EDNDPCCDT--------------NCTFRKNVTCSDKNSPCCR-GCK      44
AMO02512.1          EEGEECDAGLIGS-EDNDPCCDT--------------NCRLRPDVICSDKNAPCCR-DCR      44
XP_023216172.1      EEGEECDAGLIGS-EDNDLCCDT--------------NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR      44
XP_023216169.1      EEGEECDAGLIGS-EDNDLCCDT--------------NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR      44
                       * ** *        * **                 * ::    **   . **  .*

XP_023218512.1      LVPKVERRICFVNTPCRKEYALCDGISSYCP------82
XP_023243347.1      FVKFGDMCRAE--AEC-TLSSFCNGRSAICPMSEPKP90
AMO02515.1          LKHAGHLCRPAA-SEC-DIPEYCDGKVGQCP------73
XP_037602285.1      FELAGTRCQEPINATC-KGISTCTGNSSKCPP-----74
HemiDis             YVKEGEKCREAQPTAC-KKEALCTGESSDCPPSSPQP80
AMO02512.1          LVREREVCREAQQTAC-KQEAHCNGESPDCPPSSPQP80
XP_023216172.1      LVQRREVCREAQPLAC-KQEAHCTGESPDCPPSPAQP80
XP_023216169.1      LVQRREVCREAQPLAC-KQEAHCTGESPDCPPSPAQP80
                                    *      * *    **
```

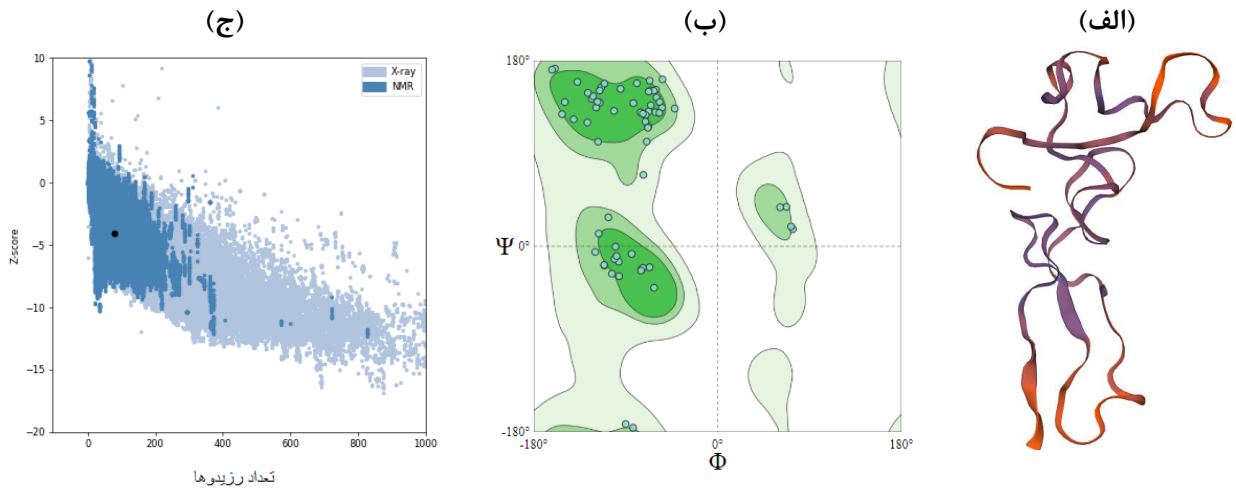
شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی و همترازی چندگانه بین توالی‌های دیس اینتگرین. همانطور که نشان داده شده است، توالی دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با سایر دیس‌اینتگرین‌ها (دومین دیس اینتگرین در ADAM پروتئین‌ها) بین ۴۰ الی ۷۰ درصد مشابهت دارد. HemiDis: دیس اینتگرین شناسایی‌شده از ترانسکریپتوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس. شناسه توالی‌ها به شرح زیر می‌باشد:

AMO02512.1: ADAM 17-like protein [Tityus serrulatus]
XP_023216172.1: ADAM 17-like protease isoform X5 [Centruroides sculpturatus]
XP_023216169.1: ADAM 17-like protease isoform X2 [Centruroides sculpturatus]
XP_037602285.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17-like isoform X1 [Sebastes umbrosus]
XP_023243347.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10-like [Centruroides sculpturatus]
AMO02515.1: disintegrin and metalloproteinase 3, partial [Tityus serrulatus]
XP_023218512.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10-like [Centruroides sculpturatus]



شکل ۲- بررسی ساختار دوم پروتئین دیس‌اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با کمک PSIPRED. آنالیز ساختار دوم پروتئین نشان داد که از بین ۸۷ اسید امینه پروتئین دیس‌اینتگرین، ۵ اسید آمینه دارای ساختار هلیکس، ۶ اسید آمینه دارای ساختار رشته و ۷۶ اسید آمینه دارای ساختار کویل می‌باشند.

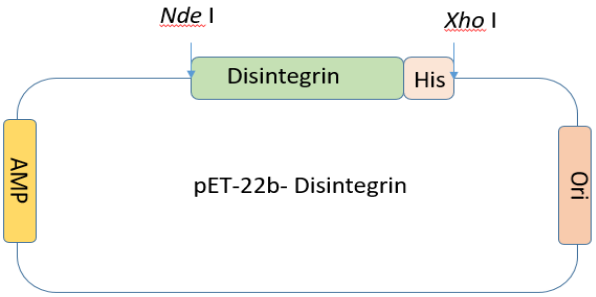
[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]



شکل ۳– ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده با سرور سوییس مدل (الف) و نمودار راماچاندران (ب). درصد اسیدآمینه‌ها در ناحیه غیرقابل‌قبول صفر درصد می‌باشد.آنالیز ساختار سه‌بعدی با پروساوب (ج). بررسی ساختار سوم پیش‌بینی‌شده نشان داد که ساختار سه‌بعدی در محدوده نرمال (Z-score -4.03) می‌باشد.

همین موضوع سبب شد در این تحقیق دیس‌اینتگرین زهر عقرب مورد توجه قرار گیرد و این ژن از زهر عقرب جداسازی و با موفقیت کلون و بیان گردد تا در تحقیقات بعدی عملکرد این پروتئین روی سلول‌های سرطان مورد ارزیابی قرار گیرد. زهر عقرب مخلوطی پیچیده از مواد دارویی فعال است که شامل پلی‌پپتیدهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. پروتیین‌ها و پپتیدها حدود ۹۰ درصد وزن خشک زهر را تشکیل می‌دهند که این پلی‌پپتیدها می‌توانند سمی یا غیرسمی باشند [۱۷]. کشف مولکول‌ها با پتانسیل دارویی از منابع طبیعی یکی از موارد با اهمیت بشمار می‌رود. ازطرفی، به‌علت شکست‌های پی‌درپی در درمان سرطان، تلاش‌ها در جهت یافتن داروی مناسب‌تر و کاراتر همچنان ادامه دارد. با کلونینگ و بیان ژن دیس‌اینتگرین زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس امید می‌رود بتواند به‌عنوان کاندیدای پیشنهادی با پتانسیل دارویی معرفی گردد.

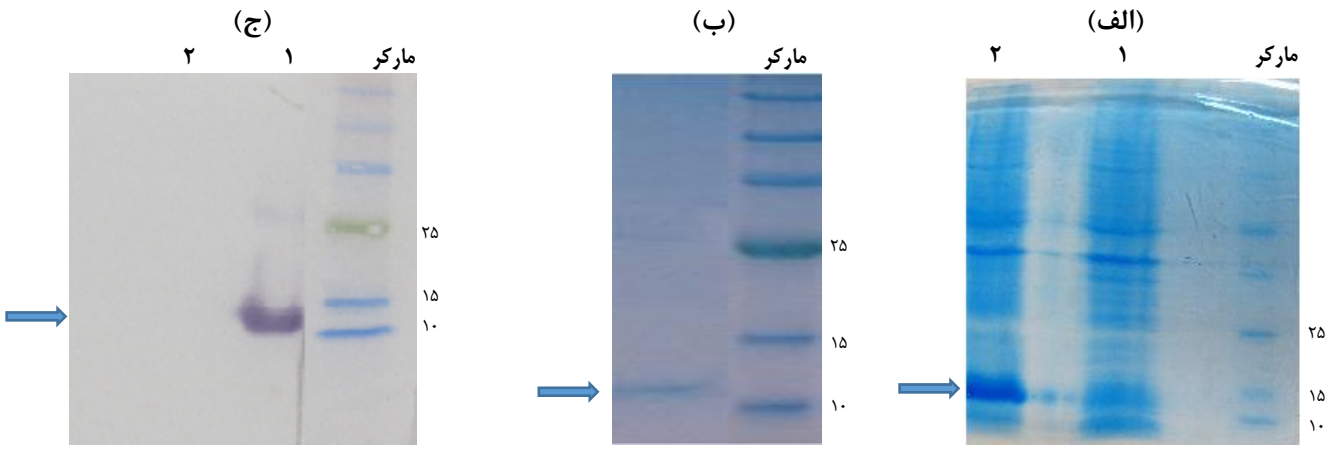
اولین مولکول شناسایی شده از زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس[۲۸]، پپتید همی‌کلسین[۲۹] می‌باشد که یک پپتید نوروتوکسیک بوده و ۶ درصد از وزن کل زهر خام را تشکیل داده و از ۳۳ اسیدآمینه تشکیل می‌شود و وزن مولکولی آن حدود ۴ کیلودالتون می‌باشد. این پپتید کانال‌های کلسیم حساس به رایانودین[۳۰] (RyR1) را در غلظت ۴۰ نانومولار مهار می‌کند [۱۸]. مطالعات ذکرشده براساس جداسازی پروتئین‌ها بدست‌آمده از زهر خام با روش‌های کروماتوگرافی و طیف‌سنجی می‌باشد [۱۹، ۱۸]. درنتیجه، تنها فعالیت بیولوژیکی این پروتئین‌ها و پپتیدها در اختیار قرار میگیرد و به‌منظور مطالعات بیشتر نیاز به توالی کامل این پروتئین‌های شناخته‌شده و سایر پروتئین‌های ناشناخته موجود در غده زهری عقرب همیسکورپیوس می‌باشد. ازطرفی، با مطالعات پروتئومیکی[۳۱] قادر به شناسایی بخشی از اجزای زهر که با غلظت بسیار پایینی در زهر توتال وجود دارند نمی‌باشیم [۲۱، ۱۸]. ازاینرو آنالیز ترانسکریپتوم غده‌ی زهر با تکنولوژی



شکل ۴– سازه نهایی حاوی ژن دیس اینتگرین به منظور سنتز و کلونینگ درون وکتور pET-22b. همانطور که در شکل نشان داده شده است ژن دیس اینتگرین بین آنزیم های محدودالاثر *Nde* I و *Xho* I کلون گردیده است.

[28] *Hemiscorpius lepturus*
[29] Hemicalcin
[30] Ryanodine
[31] Proteomics

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]



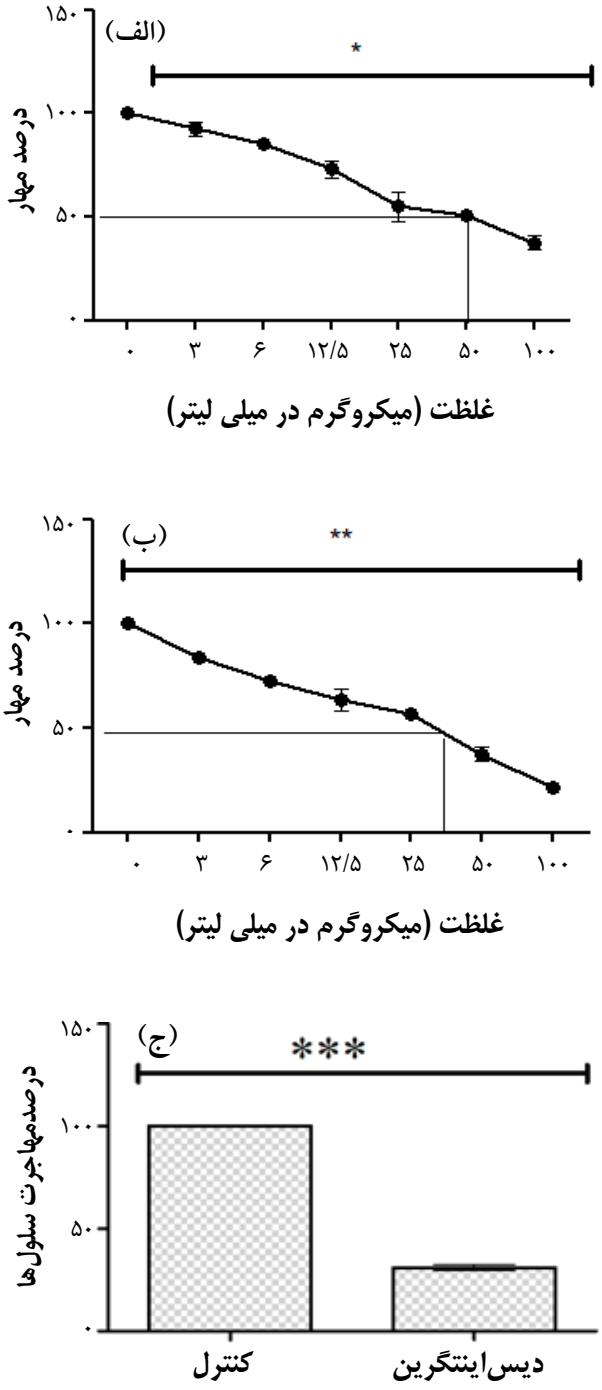
شکل ۵- نتایج بیان پروتئین. (الف): ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات ۱۵ درصد با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شده است. ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیا با ۲ مرکاپتو اتانول انجام شده است. مارکر پروتئین، ستون ۱: نمونه قبل از القا با ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید و ستون ۲ نمونه بعد از القا با ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید می‌باشد. بیان پروتئین در ستون ۲ در محدوده ۱۲ کیلو دالتون مشاهده گردید. نتایج تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. (ب): ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات بعد از تخلیص با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. (ج): وسترن بلات. وسترن بلات با آنتی‌بادی علیه برچسب هیستیدینی انجام شده است. مارکر پروتئین، ستون ۱: پروتئین تخلیص‌شده. ستون ۲: کنترل منفی. پروتئین تخلیص‌شده در ستون ۲ در محدوده ۱۲ کیلو دالتون مشاهده گردید.

توالی‌یابی نسل جدید رویکرد جدید و مقرون‌به‌صرفه‌ای جهت شناسایی کلیه‌ی اجزای زهر اعم از پروتئین‌ها، پپتیدهای سمی، آنزیم‌ها و غیره می‌باشد [۲۱، ۱۸]. مطالعات مختلفی در مورد آنالیز ترانسکریپتوم غده زهر عقرب (عقرب‌های خانواده بوتیدا[۳۲] و غیر بوتیدا[۳۳]) انجام شده است. با مطالعات صورت‌گرفته تنها درصد بسیار پایینی (کمتر از یک درصد) از توتال زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس مورد شناسایی قرار گرفته است. نتایج مطالعه توالی یابی نسل جدید به‌منظور آنالیز ترانسکریپتوم زهر عقرب خانواده همیسکورپیونیده[۳۴] مولکول‌های ارزشمندی را شناسایی کرده که تاکنون ناشناخته باقی مانده‌اند. یکی از این مولکول‌های ارزشمند دیس‌اینتگرین می باشد. در مطالعات قبلی دیس‌اینتگرین‌ها از زهر مار جداسازی می‌شده‌اند. لبین[۳۵]، دیس اینتگرین جداشده از ونوم مار است که تکثیر سلول‌های سرطانی روده انسان و رگزایی تومور را ازطریق توقف چرخه سلول و القا آپوپتوز و مهار بیان VEGF[۳۶] سرکوب می‌کند [۲۰]. دیس‌اینتگرین‌ها به اینتگرین روی سطح سلول متصل می‌شوند و تعداد زیادی از عملکردهای زیستی سلول را مهار می‌کنند. این پروتئین‌ها به‌طورعمده در زهر جانوران سمی به ویژه زهر مار یافت می‌شوند [۵].

دیس‌اینتگرین نوترکیب که به گیرنده اینتگرین αvβ3 و یا به αvβ5 متصل می‌شود خواص ضدرگزایی دارد. مطالعات روی برهم‌کنش خاص دیس‌اینتگرین نوترکیب با چندین اینتگرین دیگر نادر است [۲۱]. به‌منظور شناسایی پپتید دیس اینتگرین جداشده از روش اسپکتروفتومتری استفاده می‌شود که در این روش توالی اسیدآمینه‌ای قسمت توالی آمینی پپتید موردنظر مورد شناسایی قرار میگیرد [۲۰]. لذا در روش فوق هر بار بایستی از جانور موردنظر زهرگیری انجام شود که این پروسه علاوه بر هزینه بر و زمانبربودن نیاز به صید جانور موردنظر نیز دارد. همچنین روش زهرگیری یک فرایند پرخطر برای فرد زهر گیرنده محسوب می‌شود. بنابراین به‌منظور آنالیزهای بیشتر بر روی ترکیبات مختلف زهر ازجمله دیس‌اینتگرین ها بایستی به‌دنبال روش‌های تولید آن‌ها به‌صورت نوترکیب برویم. به‌طوری‌که در مطالعات اخیر توالی ژنی مولکول مورد نظر (دیس‌اینتگرین) با کمک روش‌های مختلفی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و سنتز ژن در وکتور بیانی کلون‌شده و سپس در میزبان باکتریایی بیان می‌گردد. به‌طورمثال، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، ژن دیس‌اینتگرین زهر مار با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر

[32] Buthidae
[33] Non- Buthidae
[34] Hemiscorpionidae
[35] Lebein
[36] Vascular Endothelial Growth Factor

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]



نمودار ۱- نتایج سمیت سلولی دیس‌اینتگرین. (الف): سمیت سلولی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون. (ب): سمیت سلولی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت سه بار تکرار انجام شده است. (ج) نتایج مهاجرت سلولی. دیس‌اینتگرین مهاجرت ۷۰ درصد سلول‌های اندوتلیال به سمت فاکتور رشد را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مهار نمود. *: تفاوت معنی‌داری با $p < ۰/۰۵$. **: تفاوت معنی‌داری با $p < ۰/۰۱$. نتایج به‌صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای معیار بیان شد. ***: تفاوت معنی داری با $p < ۰/۰۰۱$. نتایج به‌صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای معیار بیان شد.

گشته و در میزبان باکتریایی BL-21 بیان گردید. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که دیس‌اینتگرین بیان‌شده توانسته بود از تهاجم سلول‌های سرطانی جلوگیری نماید [۲۲]. نتایج سمیت سلولی نشان داد که دیس‌اینتگرین اثر مهاری بر روی بقا سلول‌های اندوتلیال انسان دارد و افزایش غلظت دیس‌اینتگرین منجر به کاهش تعداد سلول‌های زنده اندوتلیال گردید. براساس داده‌های به‌دست‌آمده، میزان $IC_{۵۰}$ برای دیس‌اینتگرین برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به‌ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. همچنین دیس‌اینتگرین توانست مهاجرت ۷۰ درصد از سلول‌های اندوتلیال به سمت فاکتور رشد را مهار نماید. درکل، این نتایج نشان می‌دهند که دیس‌اینتگرین می‌تواند به‌عنوان یک هدف مهم در مطالعات آینده مرتبط با تنظیم مهاجرت و زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال درنظر گرفته شود. استفاده از دیس‌اینتگرین به‌عنوان یک مهارکننده موثر می‌تواند در کنترل برخی از پروسه‌های بیماری‌زایی مرتبط با این سلول‌ها، مانند آنژیوژنز و متاستاز، موثر باشد. این نتایج می‌توانند به توسعه‌ی روش‌های جدید درمانی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتلیال کمک کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان داد که دیس‌اینتگرین قادر است رشد سلول‌های اندوتلیال را مهار نموده و از مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به سمت فاکتور رشد جلوگیری کند. این یافته‌ها می‌توانند به پیشرفت و توسعه روش‌های جدید درمانی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتلیال کمک کنند.

سپاسگزاری

از حمایت مالی انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌گردد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (شماره طرح ۸۵۴، کد اخلاق: IR.PII.REC.1394/42) انجام شد و بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سحر ابوالقاسمی (با شماره ۹۵/۰۱۱۰/۴۷۵) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات می‌باشد.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.ا.: انجام مطالعه؛ م.ب.: نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ ف.ک.: ایده، طراحی و نگارش مقاله.

فهرست منابع

[1] Kool J, Pharmaceutical properties of venom toxins and their potential in drug discovery. ***Indonesian J Pharm*** 27 (2016) 1-8.

[2] Utkin YN, Animal venom studies: Current benefits and future developments. ***World J Biol Chem*** 6 (2015) 28-33.

[3] Chan YS, Cheung RCF, Xia L, Wong JH, Ng TB, Chan WY, Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. ***Appl Microbiol Biotechnol*** 100 (2016) 6165-6181.

[4] Ghafourian M, Ganjalikhanhakemi N, Hemmati AA, Dehghani R, Kooti W, The Effect of Hemiscorpius lepturus (Scorpionida: Hemiscorpiidae) Venom on Leukocytes and the Leukocyte Subgroups in Peripheral Blood of Rat. ***J Arthropod Borne Dis*** 10 (2016) 159-167.

[5] Saviola AJ, Modahl CM, Mackessy SP, Disintegrins of Crotalus simus tzabcan venom: Isolation, characterization and evaluation of the cytotoxic and anti-adhesion activities of tzabcanin, a new RGD disintegrin. ***Biochimie*** 116 (2015) 92-102.

[6] Lucena S, Castro R, Lundin C, Hofstetter A, Alaniz A, Suntravat M, Sánchez EE, Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. ***Toxicon*** 93 (2015) 136-143.

[7] Chakrabarty D, Chanda C, Snake Venom Disintegrins. In: Inagaki H, Vogel CW, Mukherjee A, Rahmy T, eds, Snake Venoms. Toxinology. Dordrecht: Springer, 2017.

[8] Souza D, Iemma M, Ferreira L, Faria J, Oliva M, Zingali R, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo H, The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. ***Arch Biochem Biophys***384 (2000) 341-350.

[9] Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ, Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. ***Semin Hematol*** 31 (1994) 289-300.

[10] Suntravat M, Jia Y, Lucena SE, Sánchez EE, Pérez JC, cDNA cloning of a snake venom metalloproteinase from the eastern diamondback rattlesnake (Crotalus adamanteus), and the expression of its disintegrin domain with anti-platelet effects. ***Toxicon*** 64 (2013) 43-54.

[11] Khamessi O, Ben Mabrouk H, Othman H, ElFessi-Magouri R, De Waard M, Hafedh M, Marrakchi N, Srairi-Abid N, Kharrat R, RK, the first scorpion peptide with dual disintegrin activity on $\alpha1\beta1$ and $\alpha v\beta3$ integrins. ***Int J Biol Macromol*** 120 (2018) 1777-1788.

[12] Kazemi-Lomedasht F, Khalaj V, Bagheri KP, Behdani M, Shahbazzadeh D, The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, Hemiscorpius lepturus. ***Toxicon*** 125 (2017) 123-130.

[13] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. ***Methods Mol Biol*** 112 (1999) 531-552.

[14] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT, The PSIPRED protein structure prediction server. ***Bioinform*** 16 (2000) 404-405.

[15] Wiederstein M, Sippl MJ, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. ***Nucleic Acids Res*** 35 (2007) 407-410.

[16] David V, Wermelinger LS, Frattani FS, Lima AGF, Santos YFS, de Souza Mourão PA, Almeida FCL, Kurtenbach E, Zingali RB, rJararacin, a recombinant disintegrin from Bothrops jararaca venom: Exploring its effects on hemostasis and thrombosis. ***Arch Biochem Biophys*** 738 (2023) 109557.

[17] Rodríguez de la Vega RC, Corzo G, Possani LD, Scorpion venoms as a platform for drug development. In: King GF, ed, Venoms to drugs: Venom as a source for the development of human therapeutics. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015: 204-220.

[18] Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, Akbari A, Pessah IN, De Waard M, El Ayeb M, Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus which is active on ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels. ***Biochem J*** 404 (2007) 89-96.

[19] de la Vega RCR, Schwartz EF, Possani LD, Mining on scorpion venom biodiversity. ***Toxicon*** 56 (2010) 1155-1161.

[20] Zakraoui O, Marcinkiewicz C, Aloui Z, Othman H, Grépin R, Haoues M, Essafi M, Srairi-Abid N, Gasmi A, Karoui H, Pagès G, Essafi-Benkhadir K, Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. ***Mol Carcinog*** 56 (2017) 18-35.

[21] Kele Arruda Macedo J, W Fox J, de Souza Castro M, Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. ***Curr Protein Pept Sc*** 16 (2015) 532-548.

[22] Lima-dos-Santos I, Della-Casa M, Portes-Junior J, Calabria P, Magalhães G, Moura-da-Silva A, Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from Bothrops neuwiedi venom gland with distinct cysteine pattern. ***Toxicon*** 104 (2015) 57-64.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]

Research paper

Designing an expression construct containing the disintegrin gene identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* and evaluation of its function in an *in vitro* model

Sahar Abolghasemi[1,2], Mahdi Behdani[1], Fatemeh Kazemi-Lomedasht[*1]

[1] *Laboratory of Venom and Biotherapeutics Molecules, Biotechnology Research center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Received: 2 April 2024 Accepted: 27 May 2024

Abstract

Background and Aim: Cell adhesion plays an important role in the invasion of cancer cells. Disintegrins are considered a suitable therapeutic tool for cancer. This study aims to clone and express the disintegrin gene identified from the transcriptome of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in a bacterial host and to investigate its function in an *in vitro* model.

Methods: Initially, the first, second and third structures of disintegrin protein were investigated using bioinformatics tools. Then, the gene was synthesized and cloned into pET-22b vector. The resulting construct was transformed into *E.coli* BL-21 bacterial host. The protein expression was induced by 0.5mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. The expression was checked and confirmed by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and western blot. The protein was purified using nickel affinity chromatography under denaturing conditions. Following purification, the protein was refolded by gradually removing urea through dialysis. After protein expression and purification, the inhibitory effect of disintegrin on the survival and migration of HUVEC cell lines was investigated using MTT and transwell assay, respectively.

Results: The results of structural analysis showed that the predicted disintegrin structure exhibits typical characteristics and conforms to expected structural patterns observed in disintegrin proteins. The highest level of protein expression was observed with Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside concentration of 0.5mM and 5-hour incubation. The molecular weight of the expressed protein was approximately 12 kDa. The disintegrin inhibited the growth of HUVEC cells with an IC50 of 37 µg/ml after a 48-hour incubation period. Furthermore, the purified disintegrin inhibited the migration of 70% of HUVEC cells towards the vascular endothelia growth factor source, compared to the control group without disintegrin.

Conclusion: These findings demonstrate the potential of the disintegrin identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* to inhibit the growth and migration of HUVEC cells.

Keywords: Transcriptome, Disintegrin, *Hemiscorpius lepturus* scorpion.

Please cite this article as follows:

Abolghasemi S, Behdani M,Kazemi-Lomedasht F, Designing an an expression construct containing the disintegrin gene identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* and evaluation of its function in an *in vitro* model. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 8 (2024) 32-41.

*Corresponding authors: fa_kazemi@pasteur.ac.ir, fatemeh1044@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-5832-1822)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-12]