

Research Paper

The Effect of Tumstatin and Canstatin-Derived Angiogenesis Inhibitor Peptides on *FAK* Expression in an Animal Model of Breast CancerFatemeh Zamani¹ , Niloofar Nematzadeh Soteh¹ , *Mohammad Mehdi Heidari¹ , *Reyhane Chamani¹ , Mehri Khatami¹ , Ali Moradi²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

2. Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.



Citation Zamani F, Nematzadeh Soteh N, Heidari MM, Chamani R, Khatami M, Moradi M. [The Effect of Tumstatin and Canstatin-Derived Angiogenesis Inhibitor Peptides on *FAK* Expression in an Animal Model of Breast Cancer (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2026; 34(4):438-453. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.2401.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.2401.1>

Received: 01 Mar 2025

Accepted: 05 May 2025

Available Online: 01 Jan 2026

ABSTRACT

Background Canstatin and tumstatin are proteins derived from collagen IV that inhibit tumor growth by preventing angiogenesis. Increased focal adhesion kinase (*FAK*) expression may promote tumor progression and metastasis by stimulating the proliferation of cancer cell and angiogenesis.

Objective This study aimed to investigate the effects of peptides derived from Canstatin and Tumstatin on breast tumor growth in an animal model and on the expression of *FAK* in tumor tissue.

Methods Tumors were induced in mice by injecting 4T1 cell lines into their flank. The treatment groups were injected intraperitoneally with 5 mg/kg/day of the peptides for 12 days, while the control group received an equal volume of buffer. Tumor sizes were measured, and tumor volume was calculated using the formula $v = (\text{the smallest diameter})^2 \times (\text{the largest diameter}) \times 0.52$. Ultimately, the tumors were removed, and ribonucleic acid (RNA) was extracted from the tissues. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using primers designed for the *GAPDH* gene as a reference gene, *FAK*, and the polymerase chain reaction (PCR) method was employed. Gene expression was measured using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and $\Delta\Delta C_T$ calculation for treatment and control samples.

Results The peptides derived from Canstatin and Tumstatin inhibited tumor growth by 51% and 49%, respectively, compared to the control group ($P < 0.05$). Additionally, these peptides reduced *FAK* expression by 69% and 67%, respectively, compared to the control ($P < 0.05$).

Conclusion The present study confirmed the antitumor effects of these peptides and demonstrated that *FAK* expression reduction in tumors may be one of their antiangiogenic and anticancer mechanisms. The present results may aid in the design of new anticancer peptide drugs.

Keywords:Antiangiogenesis,
Antitumor, Collagen
IV, Focal adhesion
kinase (*FAK*)*** Corresponding Author:**

Reyhane Chamani, Ph.D.

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University,
Yazd, Iran.

Tel: +98 (35) 38210644

E-Mail: chamani@yazd.ac.ir*** Corresponding Author:**

Mohammad Mehdi Heidari, Associate Professor.

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University,
Yazd, Iran.

Tel: +98 (35) 31232652

E-Mail: heidarimm@yazd.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Canstatin and Tumstatin are endogenous angiogenesis inhibitor proteins derived from the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ chains of collagen IV, respectively. They significantly prevent angiogenesis and tumor growth in vitro and animal models [13]. Two overlapping peptides from Tumstatin, T3 (amino acids 69–88) and T7 (amino acids 74–98), are more potent than other fragments [14]. Since short peptides may have advantages over longer ones in certain aspects, such as more convenient synthesis, we recently compared the antiangiogenic and antitumor activities of a 9-amino acid peptide derived from Tumstatin (amino acids 78–86) with its corresponding sequence in Canstatin. The results showed that both peptides significantly inhibited proliferation, migration, and vascular tube formation in endothelial cells, as well as colon tumor growth in mice.

Focal adhesion kinase (FAK) is a cytoplasmic tyrosine kinase that is overexpressed and activated in several solid cancers, promoting tumor progression and metastasis. FAK controls cell motility, invasion, survival, and self-renewal of cancer stem cells [18]. FAK messenger ribonucleic acid (mRNA) levels are increased in several tumor types and inversely correlated with overall patient survival. Given the importance of FAK in the growth of cancer cells and clarification of the antitumor mechanism of peptides derived from Tumastatin (peptide T) and Canstatin (peptide C), this study aimed to investigate the effect of these peptides on breast tumor growth in mice and the expression of *FAK* in tumor tissue. No study has investigated the effect of peptides derived from these proteins on *FAK* expression. The present study sheds light on another aspect of their mechanism of action.

Methods

Peptides were synthesized by Shine Gene Biotechnology Inc. (Shanghai, China) with the amino acid sequence +3HN-LYCNP GDVC-COO- for peptide C and +3HN-LFCNVNDVC-COO- for peptide T.

A suspension containing 5×10^5 4T1 cells (a metastatic breast cell line) was injected s.c. into the right flank of mice. When the tumor volume reached approximately 200 mm³, tumor-bearing mice were randomly divided into control and treatment groups (n=3) and received phosphate-buffered saline (PBS) and 5 mg/kg/day of peptides (i.p. injection), respectively, for twelve days. Tumor

dimensions were measured, and tumor volumes were calculated using the Equation 1:

$$1. v = a^2 \times b \times 0.52,$$

where a is the smallest and b is the largest tumor diameter. Data were represented as Mean $\pm$ SE.

RNA was extracted from tumor tissues according to the manufacturer's protocol. The primers required for the amplification of *FAK* and *GAPDH* genes (Table 1) were designed using this software. The Pars Toos kit was used for Complementary DNA (cDNA) synthesis. For real-time polymerase chain reaction (PCR), appropriate volumes of Mastermix, cDNA, and primers were mixed and brought up to 20 μ L with sterile double-distilled water. The four-step PCR was programmed as follows: A 15-minute holding step at 95 °C, an initial 30-second denaturation step at 95 °C, a 30-second annealing step at 65 °C, and a 30-second extension step at 72 °C. All programs were run with at least three independent cDNA samples. Finally, the cycle threshold (CT) values of genes in the treated and control samples were calculated. The CT of the *FAK* was subtracted from the CT of the *GAPDH*, and the Δ CT value was obtained for the treated and control samples. The relative expression graph was displayed based on $2^{-\Delta CT}$. Data were represented as Mean $\pm$ SE. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

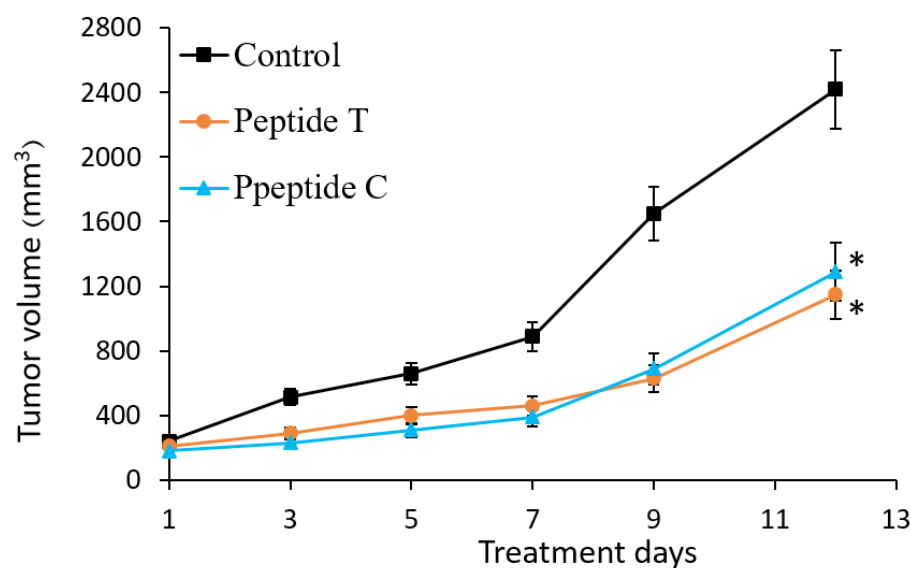
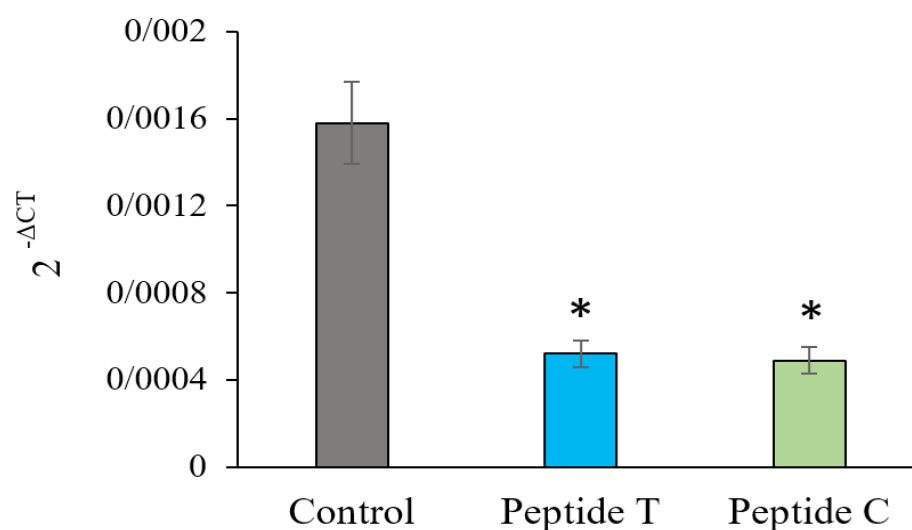
Peptides C and T prevented tumor growth by 51% and 49%, respectively, compared to the control group (Figure 1) ($P < 0.05$). However, the difference between the two treatment groups was not significant. Peptides C and T reduced *FAK* expression by 69% and 67%, respectively, compared to the control group ($P < 0.05$) (Figure 2). No significant difference was observed between the effects of the two peptides on *FAK* expression.

Conclusion

The present study showed that short antiangiogenic peptides derived from collagen IV can inhibit breast tumor growth in mice by approximately 50% and reduce the expression of *FAK*, a crucial gene involved in the growth, proliferation, and metastasis of cancer cells. Given the anticancer effects of these peptides, which also have potential applications in tumor diagnosis and targeted drug delivery, further preclinical studies to determine their optimal dosage and toxicity would be beneficial.

Table 1. Sequence of primers used in the RT-PCR

Gene	Primer	Primer Sequence	RefSeq (nm)
FAK	Forward	5'-CCATGCCCTCGAAAAGCTATG-3'	1553-1573
	Reverse	5'-TGACGCATTGTTAAGGCTTCT-3'	1761-1781
GAPDH	Forward	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'	569-591
	Reverse	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	1043-1064

Journal of
Guilan University of Medical SciencesJournal of
Guilan University of Medical Sciences**Figure 1.** The effect of peptides derived from canstatin (C peptide) and tumestatin (T peptide) on breast tumor growth in miceJournal of
Guilan University of Medical Sciences**Figure 2.** The effect of peptides derived from canstatin (C peptide) and tumestatin (T peptide) on *FAK* gene expression in breast tumor tissue

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Yazd University](#), Yazd, Iran (Code: IR.YAZD.REC.1402.058).

Funding

This article was extracted from master's thesis of Fatemeh Zamani and Niloofar Nematzadeh, approved by Department of Biology, [Yazd University](#), Yazd, Iran.

Authors contributions

Conceptualization, study design and study supervision: Reyhane Chamani and Mohammad Mehdi Heidari; Data collection, data analysis and Statistical analysis: Fatemeh Zamani and Niloofar Nematzadeh Soteh; Drafting of the manuscript: Reyhane Chamani and Mehri Khatami; Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Mohammad Mehdi Heidari and Ali Moradi; Administrative, technical, or material support: Ali Moradi.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are gratefully acknowledge the support of the Research and Technology Deputy of [Yazd University](#) for their assistance in conducting this study.

This Page Intentionally Left Blank



مقاله پژوهشی

اثر پپتیدهای مهارکننده رگ‌زایی مشتق از تومستاتین و کانستاتین بر بیان FAK در مدل حیوانی سرطان پستان

فاطمه زمانی^۱، نیلوفر نعمت‌زاده سوته^۱، محمد مهدی حیدری^۱، *ریحانه چمنی^۱، مهری خاتمی^۱، علی مرادی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Zamani F, Nematzadeh Soteh N, Heidari MM, Chamani R, Khatami M, Moradi M. [The Effect of Tumstatin and Canstatin-Derived Angiogenesis Inhibitor Peptides on FAK Expression in an Animal Model of Breast Cancer (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2026; 34(4):438-453. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.2401.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.34.4.2401.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۱ اسفند ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۴

زمینه: افزایش بیان کیناز چسبندگی کانونی (FAK) می‌تواند موجب پیشرفت و متاستاز تومور از طریق تحریک تکثیر و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی شود. کانستاتین و تومستاتین پروتئین‌های مشتق از کلانژن IV بوده که می‌توانند با مهار رگ‌زایی از رشد تومور جلوگیری کنند. **هدف:** مطالعه حاضر به بررسی اثر پپتیدهای مشتق از کانستاتین و تومستاتین بر میزان رشد تومور پستان در مدل حیوانی و بیان FAK در بافت تومور می‌پردازد.

روش‌ها: تومورها با تزریق سلول‌های 4T1 به پهلوی موش‌ها ایجاد شدند. به گروه‌های تیمار دز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روز از پپتیدها و به گروه کنترل حجم مساوی از بافر به صورت صفاقی به مدت ۱۲ روز تزریق شد (n=۳). ابعاد تومورها اندازه‌گیری و حجم تومورها با فرمول $\frac{4}{3} \times (\text{بزرگ‌ترین قطر}) \times (\text{کوچک‌ترین قطر})^2$ محاسبه شد. در پایان تومورها برداشته و استخراج RNA از بافت‌ها انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای GAPDH به عنوان ژن مرجع و FAK و روش PCR انجام شد. میزان بیان با روش RT-PCR و محاسبه $\Delta\Delta CT$ ژن‌ها در نمونه‌های تیمار و کنترل سنجیده شد.

یافته‌ها: پپتیدهای مشتق از کانستاتین و تومستاتین به ترتیب ۵۱ و ۴۹ درصد از رشد تومور در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری کردند ($P < 0.05$). همچنین این پپتیدها به ترتیب ۶۹ و ۶۷ درصد بیان FAK را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر اثر ضدسرطانی این پپتیدها را تأیید کرد و نشان داد کاهش بیان FAK در تومورها می‌تواند یکی از مسیرهای اثرات ضد رگ‌زایی و ضدسرطانی آن‌ها باشد. یافته‌های این مطالعه می‌تواند به طراحی داروهای پپتیدی ضدسرطان جدید کمک کند.

کلیدواژه‌ها:

ضد رگ‌زایی، ضد تومور، کلانژن IV، کیناز چسبندگی کانونی

* نویسنده مسئول:

دکتر محمد مهدی حیدری

نشانی: یزد، دانشگاه یزد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۳۱۲۳۲۶۵۲ (۳۵) ۰۹۸

رایانامه: heidarimm@yazd.ac.ir

* نویسنده مسئول:

دکتر ریحانه چمنی

نشانی: یزد، دانشگاه یزد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۳۸۲۱۰۶۴۴ (۳۵) ۰۹۸

رایانامه: chamani@yazd.ac.ir



Copyright © 2026 The Author(s);

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY-NC: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode.en>), which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

مقدمه

هستند [۷]. به عنوان مثال پپتید VEGB1 پادکنشگر^۶ فاکتور رشد اندوتلیال عروق^۷ و مهارکننده گیرنده VEGFR1 است که قادر است رگ‌زایی و رشد تومور را به طور معنی‌داری مهار کرده و بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹ دخیل در مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز)^۸ را افزایش دهد [۸]. همچنین این پپتید بیان یکی از microRNAهای مهم در رگ‌زایی یعنی miR-210 را کاهش می‌دهد [۹]. هزینه تولید کمتر، ایمنی‌زایی کم، اختصاصیت بالا و نفوذپذیری به داخل بافت‌ها از مزیت‌های به کارگیری پپتیدها است. هرچند پپتیدها دارای محدودیت‌هایی مانند نیمه عمر کوتاه و پایداری کم هستند که می‌توان به کمک روش‌هایی بر این محدودیت‌ها غلبه کرد [۱۰].

کلاژن IV اصلی‌ترین کلاژن موجود در لایه‌های ماتریکس خارج سلولی است. این پروتئین در مهره‌داران دارای ۶ زنجیره α مختلف ($\alpha 1$ تا $\alpha 6$) است [۱۱]. قطعه‌ای که توسط برش آنزیمی از زنجیره $\alpha 2$ کلاژن IV جدا می‌شود، کانستاتین^۹ نام دارد که دارای فعالیت‌های ضد رگ‌زایی و ضد توموری است [۱۲]. کانستاتین می‌تواند از تکثیر، مهاجرت و تشکیل ساختارهای لوله‌مانند^{۱۰} در سلول‌های اندوتلیال رگی، از طریق اثر بر مسیرهای FAK-PI3K/Akt^{۱۱} جلوگیری کرده [۱۳] و آپوپتوز را در رده‌های سلولی سرطان کولون انسانی فعال کند [۱۴]. قطعه انتهایی آمین کانستاتین (اسید آمینه‌های ۸۹-۱) بیشتر از قطعه انتهایی کربوکسیل آن، آپوپتوز را فعال می‌کند. همچنین هر دو قطعه می‌توانند رشد تومور ملانوما را در موش‌ها مهار کنند [۱۵].

تومستاتین^{۱۲} از زنجیره $\alpha 3$ کلاژن IV جدا می‌شود و یک مهارکننده قوی رگ‌زایی و رشد تومور در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی است [۱۶]. چندین مطالعه برای شناسایی پپتید فعال در پروتئین تومستاتین انجام و مشخص شد دو پپتید که از نظر توالی اسید آمینه‌ای همپوشانی دارند، به نام‌های T3 (اسید آمینه‌های ۶۹-۸۸) و T7 (اسید آمینه‌های ۷۴-۹۸) فعال‌تر از سایر قطعات پروتئین کامل هستند [۱۷]. جهش‌زایی اسید آمینه‌ها نشان داد لوسین ۷۸، والین ۸۲ و آسپارات ۸۴ برای فعالیت ضد رگ‌زایی تومستاتین از طریق اتصال به گیرنده اینتگرین $\alpha v \beta 3$ روی اندوتلیوم در حال تکثیر رگ‌های اطراف تومور ضروری هستند [۱۸]. علاوه بر این گرافتون و همکاران نشان دادند یک پپتید کوتاه‌تر، شامل تنها ۱۵ اسید آمینه همپوشان با پپتیدهای T7 و T3، زنده‌مانی و تشکیل ساختارهای لوله‌مانند سلول‌های اندوتلیال را در شرایط آزمایشگاهی کاهش داد [۱۹].

6. Antagonist
7. Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGFB)
8. Apoptosis
9. Canstatin
10. Tube-like structure
11. Phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B (or Akt)
12. Tumstatin

سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است [۱]. علی‌رغم اثربخشی نسبی داروهای شیمی‌درمانی، سمیت شدید آن‌ها و ایجاد مقاومت دارویی در بیماران، محققان را به سمت کشف داروهای ایمن‌تر و مؤثرتر سوق داده است. سلول‌های سرطانی برای دریافت مواد غذایی، اکسیژن، دفع مواد زائد و متاستاز به تشکیل رگ‌های خونی جدید در اطراف خود وابسته هستند؛ فرایندی که رگ‌زایی^۱ نام دارد. بنابراین جلوگیری از این فرایند می‌تواند یک راهکار درمانی نویدبخش باشد. آزمایش‌های پیش‌بالینی و بالینی متعدد، اثربخشی مهارکننده‌های رگ‌زایی را در جلوگیری از رشد و متاستاز تومور تأیید کرده‌اند [۲]. علاوه بر این رگ‌های اطراف تومورها، از نظر ریخت‌شناسی غیرطبیعی و نفوذپذیرتر از رگ‌های عادی هستند که این امر موجب دارورسانی کم به سلول‌های سرطانی می‌شود. استفاده هم‌زمان از مهارکننده‌های رگ‌زایی و سایر داروها می‌تواند رگ‌های توموری را به حالت طبیعی برگردانده و دارورسانی را بهبود بخشد [۳، ۴].

کیناز چسبندگی کانونی^۲ که با نام پروتئین تیروزین کیناز^۳ نیز شناخته می‌شود، یک تیروزین کیناز غیروابسته به گیرنده است که توسط ژن پروتئین تیروزین کیناز ۲ واقع در ناحیه کروموزومی 8q24/3 کد می‌شود و پیشرفت تومور و متاستاز را از طریق تأثیر بر سلول‌های سرطانی و همچنین سلول‌های استرومایی ریز محیط تومور تحریک می‌کند. کیناز چسبندگی کانونی تحرک سلولی، تهاجم، بقا و خودنوسازی^۴ سلول‌های بنیادی سرطانی را کنترل می‌کند [۵]. براساس داده‌های پایگاه اطلس ژنوم سرطان^۵، سطوح mRNA کیناز چسبندگی کانونی، در چندین نوع تومور، مانند سرطان تخمدان و سرطان‌های تهاجمی پستان افزایش می‌یابد که با میزان بقای کلی بیمار رابطه عکس دارد. در چندین مدل موش تراریخته نیز اهمیت افزایش بیان و فعالیت کیناز چسبندگی کانونی در سلول‌های اندوتلیال در زمان ایجاد رگ‌های خونی جدید در اطراف تومور نشان داده شده است. همچنین کیناز چسبندگی کانونی آپوپتوز را مهار کرده و تکثیر سلول‌های اندوتلیال را افزایش می‌دهد [۶].

پپتیدها توالی‌هایی با طول حداکثر ۴۰ اسید آمینه هستند و به دلیل پیشرفت در فناوری‌های سنتزی، از سال ۲۰۰۰ تاکنون، بیش از ۳۳ داروی پپتیدی برای درمان اختلالات و بیماری‌های مختلف، مانند دیابت، چاقی، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان تأیید شده‌اند. علاوه بر این بیش از ۱۷۰ پپتید در مراحل مختلف آزمایش‌های بالینی و تعداد زیادی نیز تحت مطالعات پیش‌بالینی

1. Angiogenesis
2. Focal Adhesion Kinase (FAK)
3. Protein tyrosine kinase 2 (PTK2)
4. Self-renewing
5. The Cancer Genome Atlas (TCGA)

ابتدا محلول رویی از فلاسک خارج و ۲ میلی‌لیتر از محلول تریپسین - اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^{۱۶} به فلاسک اضافه شد. با وارد کردن چند ضربه به کف فلاسک، سلول‌ها جدا و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. بعد از اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، سلول‌ها با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۳ تا ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به حالت تعلیق درآمد. سوسپانسیون حاوی $10^5 \times 5$ سلول 4T1 برای تزریق به موش‌ها استفاده شد [۲۰]

ایجاد تومور در موش‌ها

مطالعه تحلیلی مداخله‌ای حاضر براساس اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه یزد انجام شد و توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه یزد (شناسه تأیید: IR.YAZD.REC.1402.058) تأیید شد. موش‌های ماده نژاد BALB/c (۶ تا ۸ هفته‌ای، خریداری‌شده از انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران) تحت یک چرخه ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند.

جهت ایجاد تومور در موش‌ها، سوسپانسیون حاوی $10^5 \times 5$ سلول 4T1 در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI به صورت زیرجلدی به سمت راست موش‌ها تزریق شد. ابعاد تومورها توسط یک کولیس اندازه‌گیری و حجم تومورها (v) با استفاده از فرمول $v = a^2 \times b \times 0.52$ محاسبه شد که در آن a کوچک‌ترین قطر و b بزرگ‌ترین قطر تومور است. هنگامی که حجم تومور به حدود ۲۰۰ میلی‌متر مکعب رسید، موش‌های دارای تومور به صورت تصادفی به گروه‌های کنترل و تیمار (تعداد ۳ موش در هر گروه) تقسیم شدند [۲۰]. به گروه‌های تیمار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز پپتید به صورت درون‌صفافی تزریق شد، درحالی‌که موش‌های گروه کنترل حجم مساوی از بافر فسفات نمکی^{۱۷} به مدت ۱۲ روز دریافت کردند. در این مدت موش‌ها به طور مرتب از نظر نشانه‌های غیرمعمول و عوارض جانبی تحت نظر قرار گرفتند. ابعاد تومورها هر یک روز در میان توسط یک کولیس اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول گفته‌شده در بالا حجم تومورها محاسبه شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد^{۱۸} ثبت شدند. در پایان، موش‌ها با تزریق ماده بیهوشی کتامین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با نسبت ۱ به ۱۰ بیهوش و سپس با استفاده از روش جابه‌جایی مهره گردن کشته شدند. تومورها خارج و با قرار گرفتن روی یخ به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد، جهت انجام آزمایش‌های بعدی منتقل شدند.

از آنجایی که کشف پپتیدهای کوتاه و کارا می‌تواند نسبت به پپتیدهای بلندتر، از برخی جنبه‌ها، مانند سنتز آسان‌تر، دارای مزیت باشد، اخیراً ما در مطالعه‌ای، فعالیت‌های ضدگرزایی و ضدتوموری یک پپتید ۹ اسیدآمینه‌ای مشتق از تومستاتین، دارای اسیدآمینه‌های لوسین ۷۸، والین ۸۲ و آسپاراتات ۸۴ را با توالی متناظر آن در کانستاتین مقایسه کردیم. پپتید مشتق از کانستاتین، در موقعیت ۸۲ به جای والین دارای پرولین بود. نتایج نشان دادند هر دو پپتید توانستند به طور معناداری تکثیر، مهاجرت و تشکیل ساختارهای لوله‌مانند را در سلول‌های اندوتلیال و رشد تومور کولون را در موش مهار کنند که پپتید مشتق از کانستاتین، مؤثرتر از پپتید مشتق از تومستاتین بود [۲۰]. با توجه به اهمیت کیناز چسبندگی کانونی در رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی و همچنین مشخص نبودن مکانیسم ضدتوموری پپتیدهای مشتق از تومستاتین (با نام پپتید T) و کانستاتین (با نام پپتید C) از دیدگاه مولکولی، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر این پپتیدها بر میزان رشد تومور پستان در مدل حیوانی و FAK کانونی در بافت تومور بود. تاکنون در هیچ مطالعه‌ای اثر پپتیدهای مشتق از تومستاتین و کانستاتین بر بیان کیناز چسبندگی کانونی بررسی نشده است و مطالعه حاضر می‌تواند بعد دیگری از مکانیسم اثر این پپتیدهای ضدسرطان را روشن کند.

روش‌ها

سنتز پپتیدها

پپتیدهای ۹ اسیدآمینه‌ای توسط شرکت Shine Gene Bio-technologies Inc. (شانگهای، چین) به روش سنتز شیمیایی و با توالی اسیدآمینه‌ای -COO-LYCNP GDVC-3HN+ برای پپتید مشتق از کانستاتین (با نام پپتید C) و توالی -COO-LFCNVND-3HN+ برای پپتید مشتق از تومستاتین (با نام پپتید T) سنتز شدند. توالی این دو پپتید از نظر سه اسیدآمینه متفاوت است که زیر اسیدآمینه‌های متفاوت خط کشیده شده است. خلوص محصول (۹۰ درصد) توسط شرکت سازنده با انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^{۱۳} تأیید شد.

کشت رده سلولی 4T1

رده سلولی متاستازی سرطان پستان 4T1 از دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تهیه شد و در محیط کشت RPMI^{۱۴} همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۵} غیرفعال شده، استریل‌شده و پنی‌سیلین، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شد. ۲ تا ۳ روز پس از کشت اولیه زمانی که تراکم سلول‌ها به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید،

16. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
17. Phosphate Buffer Saline (PBS)
18. Standard error

13. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
14. Roswell Park Memorial Institute
15. Fetal Bovine Serum (FBS)

استخراج RNA از بافت تومور

به ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم از بافت تومورها، ۱ میلی لیتر محلول تریزول RNX-PLUS (تهیه شده از شرکت سیناکلون) جهت تخریب سلول ها و خارج کردن RNA، اضافه و همگن شدند. بعد از ۵ دقیقه قرار دادن در دمای محیط، با ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم جهت تکمیل فرایند لیز سلول مخلوط و ۵ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. سپس با دور ۱۲۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. به فاز رویی که حاوی RNA است، هم حجم فاز رویی ایزوپروپانول اضافه و به آرامی مخلوط شدند. به مدت ۱۵ دقیقه به منظور رسوب دادن هر چه بیشتر RNA روی یخ قرار داده شدند. سپس با دور ۱۲۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و به هر نمونه ۱ میلی لیتر الکل ۷۵ درصد جهت شست و شو و آبگیری از RNA اضافه شد. سپس با دور ۷۵۰۰ rpm به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و بعد از نیمه خشک شدن، به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر برای حل کردن RNA اضافه و جهت حل شدن بهتر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۸ سانتی گراد قرار داده شد. مقداری از محلول RNA جهت بررسی کمی و کیفی و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت و مابقی در فریزر -۸۰ سانتی گراد نگهداری شد. یکپارچگی RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و مشاهده باندهای مربوط به ۱۸S rRNA و ۲۸S rRNA تعیین شد. غلظت و کیفیت RNA توسط سنجش جذب در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و محاسبه نسبت ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از طیف سنج نانودراپ تعیین شد [۲۱].

سنتز cDNA

پرایمرهای مورد نیاز برای تکثیر ژن های *FAK* و *GAPDH* (به عنوان ژن مرجع یا کنترل داخلی) با استفاده از نرم افزارهای *gene runner*، *oligo analyzer* و *primer blast* طراحی شدند که توالی آن ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. از کیت پارس طوس جهت سنتز cDNA مطابق با روشی که در ادامه آورده شده است استفاده شد. بر اساس غلظت RNA، حجم مورد استفاده برای سنتز cDNA برای هر نمونه و حجم آب دوبار تقطیر برای حجم ۲۰ میکرولیتر طبق آن محاسبه و در میکروتیوب ریخته شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر بافر کیت حاوی RTbuffer, dNTP 1mM, MgCl2 8mM, Oligo dt primer, Randomhexamer thermostable که حاوی ۲ میکرولیتر آنزیم که حاوی *H-minus MMLV*, *RNAse Inhibitor*, *stabilizer* بود، اضافه شد. میکروتیوب ها طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند:

مرحله اتصال^{۱۹} به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد، مرحله نسخه برداری معکوس به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی گراد و مرحله غیرفعال شدن آنزیم ترنسکریپتاز معکوس به مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد [۲۱].

Real Time-PCR

برای انجام Real Time-PCR (RT-PCR)، ۴ میکرولیتر مسترمیکس FIREPol 1X، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو ۱۲۵ میکرومولار و ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس ۱۲۵ میکرومولار مخلوط و با آب استریل دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شدند. PCR چهار مرحله ای به شرح زیر برنامه ریزی شد:

مرحله توقف به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله واسرشتگی^{۲۰} اولیه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و مرحله گسترش^{۲۱} به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. همه برنامه ها با حداقل ۳ نمونه cDNA مستقل اجرا شدند. در پایان چرخه آستانه^{۲۲} ژن ها در نمونه های تیمار و کنترل محاسبه شد. چرخه آستانه ژن *FAK* از چرخه آستانه ژن *GAPDH* کم شد و مقدار ΔCT برای نمونه های تیمار و کنترل به دست آمد و نمودار بیان نسبی بیان بر اساس $\Delta CT-2$ رسم شد. بعد از انجام RT-PCR برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز ۲/۵ درصد انجام شد [۲۲].

بررسی های آماری

از برنامه SPSS نسخه ۲۲ برای بررسی های آماری استفاده شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شد. با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنف نرمال بودن توزیع داده ها بررسی و تأیید شد. سپس مقایسه بین میانگین ۲ گروه با استفاده از آزمون پارامتریک تی مستقل^{۲۳} و مقایسه برابری واریانس ها با آزمون لون^{۲۴} انجام شد. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر پپتیدها بر رشد تومور پستان در مدل حیوانی

جهت بررسی اثر پپتیدها بر رشد تومور پستان در موش ها، روزانه دُز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم از پپتیدها به صورت صفاقی

19. Anneling
20. Denaturation
21. Extension
22. Cycle threshold
23. Parametric independent T-test
24. Levene's test

به موش‌های گروه تیمار تزریق و ابعاد تومورها یک روز در میان اندازه‌گیری شد (تصویر شماره ۱: الف تا ج). هیچ‌گونه نشانه غیرطبیعی در موش‌ها در طی دوره درمان مشاهده نشد. نتایج نشان دادند که میانگین حجم تومورها در سراسر دوره تیمار در گروه کنترل 1060 ± 195 ، در گروه تیمار با پپتید C 93 ± 518 و در گروه تیمار با پپتید T 55 ± 41 میلی‌مترمکعب بود. پپتیدها توانستند به‌صورت معناداری در مقایسه با گروه کنترل از رشد تومور جلوگیری کنند (تصویر شماره ۱: د) ($P < 0.05$). درصد مهار رشد تومور در مقایسه با کنترل به ترتیب برای پپتید C و پپتید T ۵۱ و ۴۹ درصد بود. هرچند، مقایسه بین ۲ گروه تیمار، اختلاف معناداری را بین اثر ۲ پپتید بر مهار رشد تومور نشان نداد.

اثر پپتیدها بر بیان ژن FAK در بافت تومور

برای سنجش میزان بیان ژن FAK در بافت تومور، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها و سنتز cDNA انجام شد. نسبت جذب $260/280$ نمونه‌ها جهت بررسی‌های کیفی ثبت شد که برای تمام نمونه‌ها این نسبت بین $1/8$ تا 2 بود که نشان‌دهنده خلوص بالا و عدم آلودگی نمونه‌های RNA و cDNA بود. همچنین غلظت cDNAهای سنتز شده بین 878 تا 1161 نانوگرم بر میکرولیتر به دست آمد. سپس، با استفاده از روش RT-PCR میزان بیان FAK در گروه‌های کنترل و تیمار اندازه‌گیری و به کمک محاسبه $\Delta\Delta CT$ بیان آن نسبت به بیان ژن مرجع GAPDH نرمال‌سازی شد. براساس منحنی ذوب حاصل از RT-PCR، دمای ذوب برای ژن‌های FAK و GAPDH در نمونه‌های تیمار و کنترل به ترتیب برابر با $84/69$ و $91/08$ درجه سانتی‌گراد بود. نمودار بیان نسبی براساس $2^{-\Delta CT}$ رسم شد (تصویر شماره ۲). همان‌طور که در تصویر شماره ۲ مشخص است، میزان بیان نسبی FAK در گروه کنترل $10^{-4} \pm 4 \times 10^{-4}$ ، در گروه تیمار با پپتید C $10^{-4} \pm 6 \times 10^{-4}$ و در گروه تیمار با پپتید T $10^{-4} \pm 7/5 \times 10^{-4}$ به دست آمد و اختلاف بین گروه‌های تیمار نسبت کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). درصد کاهش بیان ژن برای پپتیدهای C و T به ترتیب برابر با ۶۹ و ۶۷ درصد محاسبه شد. هرچند اختلاف معناداری بین اثر ۲ پپتید بر بیان FAK مشاهده نشد.

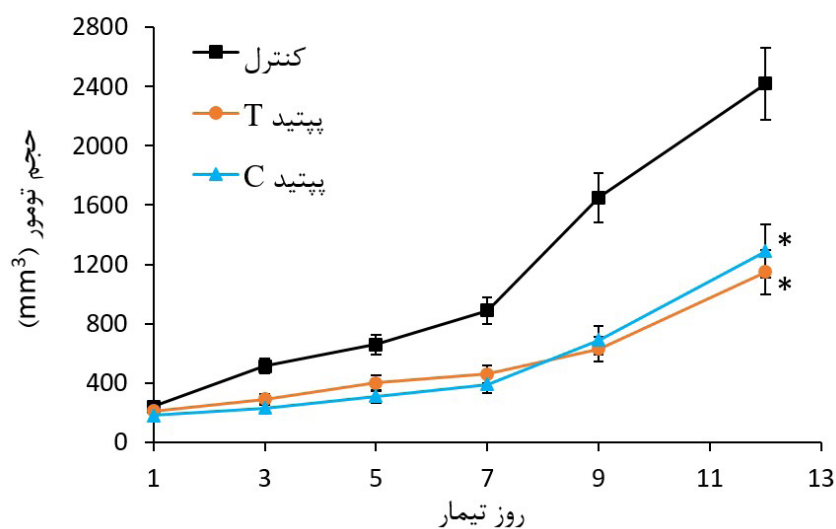
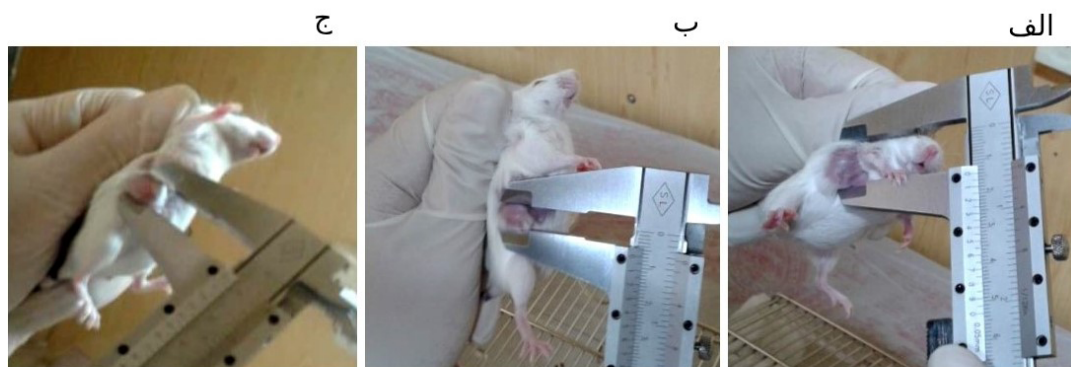
بحث

در مطالعه حاضر نشان داده شد ۲ پپتید ۹ اسیدآمینه‌ای مشتق از پروتئین‌های کانستاتین و تومستاتین به ترتیب ۵۱ و ۴۹ درصد رشد تومور پستان را در موش در مقایسه با کنترل مهار کرده و به ترتیب موجب ۶۹ و ۶۷ درصد کاهش بیان ژن کیناز چسبندگی کانونی شدند که در رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی دخالت دارد.

در مطالعه پیشین نشان داده شد دُز ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز پپتیدهای C و T به ترتیب ۳۱ و ۱۸ درصد از رشد سرطان روده بزرگ در موش جلوگیری کرد که اختلاف بین اثر دو پپتید معنی‌دار بود [۲۰]. در مطالعه حاضر، برای روشن شدن بیشتر مکانیسم مولکولی این دو پپتید، ابتدا اثر آن‌ها بر رشد تومور پستان در موش و سپس بر میزان بیان FAK در بافت تومور بررسی شد. نتایج نشان داد پپتیدهای C و T توانستند به‌طور معناداری رشد تومور را در مقایسه با کنترل به ترتیب به میزان ۵۱ و ۴۹ درصد مهار کنند. هرچند بین نتایج دو پپتید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اینکه چرا در مطالعه پیشین اختلاف بین اثر ضدتوموری ۲ پپتید معنی‌دار بود، ولی در مطالعه حاضر این‌گونه نبود می‌تواند به تفاوت در نوع سلول توموری استفاده‌شده (رده سلولی CT۲۶ در مقابل CT۱)، دُز تیمار (۶ در مقابل ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روزهای تیمار (۱۴ روز در مقابل ۱۲ روز) مرتبط باشد.

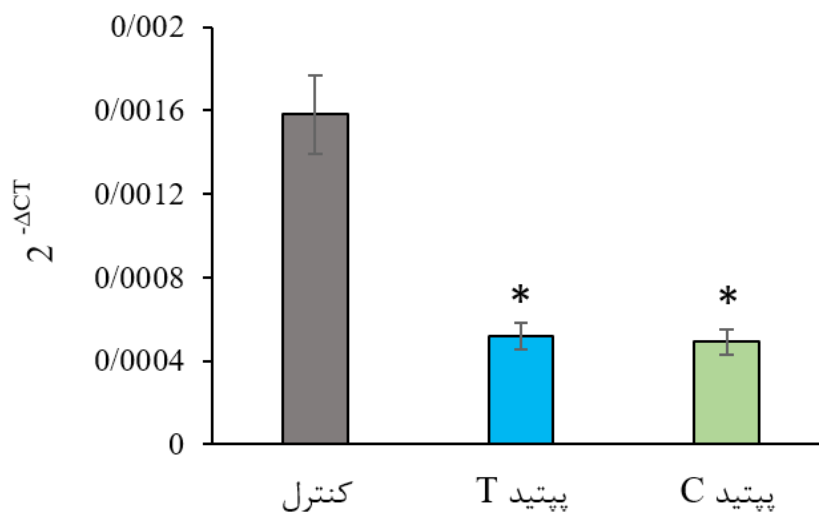
به‌طور کلی اثرات ضدتوموری این پپتیدها در راستای مطالعات پیشین بر روی سایر قطعات مشتق از کانستاتین، تومستاتین و کلاژن IV است که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود. کواگوچی و همکاران نشان دادند تزریق روزانه ۴۰ میکرومول بر لیتر پپتید ۲۰ اسیدآمینه‌ای مشتق از تومستاتین با نام T3 به مغز موش‌ها از طریق فناوری دارورسانی با همرفت^{۲۵} به مدت ۷ روز رشد تومور مغزی گلیوبلاستوما را از طریق اتصال به گیرنده اینتگرین $\alpha V\beta 3$ و مسیر PTEN/Akt/mTOR مهار می‌کند [۲۳]. همچنین نشان داده شد پپتید ۲۵ اسیدآمینه‌ای مشتق از تومستاتین با نام T7 قادر بود به‌طور چشمگیری رشد تومور کارسینومای ریه لئویس^{۲۶} را در مدل حیوانی مهار کند [۱۸]. دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از پپتید ۷ اسیدآمینه‌ای (اسیدآمینه‌های ۹۱۱-۱۸۵ از تومستاتین) و فرم حلقوی آن پس از ۸ روز تیمار توانستند به ترتیب ۲۷ و ۴۶ درصد جلوی رشد تومور ملانوما را بگیرند [۲۴]. تزریق روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از قطعه انتهایی آمین کانستاتین (اسیدآمینه‌های ۸۹-۱) توانست رشد تومور ملانوما را در موش پس از ۸ روز تقریباً به‌طور کامل متوقف کند [۲۵]. همچنین دُزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک پپتید ۲۰ اسیدآمینه‌ای مشتق از کلاژن IV با نام SP2043 توانست پس از ۳۳ روز به ترتیب ۷۷ و ۹۰/۷ درصد رشد تومور پستان را بدون سمیت مهار کند [۲۶] و همین‌طور ۷۰ درصد مهار رشد کارسینومای هپاتوسلولار در موش پس از ۲ هفته تیمار با دُز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این پپتید مشاهده شد [۲۷]. دُزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از پپتید مشتق از پنتاستاتین^{۲۷} (زنجیره $\alpha 5$ کلاژن IV) با توالی LRRFSTMPFMFCNINNVCFN که با توالی پپتید T3 شباهت دارد، پس از ۱۲ روز به ترتیب ۲۰ و ۵۳ درصد رشد تومور ریه سلول کوچک^{۲۸} را در موش مهار کردند [۲۸].

25. Convection-Enhanced Delivery (CED)
26. Lewis lung carcinoma
27. Pentastatin
28. Small cell lung cancer



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۱. اثر پیتیدهای مشتق از کانستاتین (پیتید C) و تومستاتین (پیتید T) بر رشد تومور پستان در مدل حیوانی. الف) کنترل، ب) تیمار با پیتید C، ج) تیمار با پیتید T، د) نمودار میانگین حجم تومورها در طی روزهای تیمار. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل است ($P < 0.05$). هر نقطه برابر با میانگین $\pm$ نمونه خطای استاندارد است.



مجله دانشگاه علوم پزشکی کیران

تصویر ۲. اثر پیتیدهای مشتق از کانستاتین (پیتید C) و تومستاتین (پیتید T) بر بیان ژن کیناز چسبندگی کانونی در بافت تومور پستان. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با کنترل است ($P < 0.05$). هر ستون برابر با میانگین $\pm$ تکرار ۳ خطای استاندارد است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش RT-PCR

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	RefSeq (nm)
FAK	پیشرو	۵'-CCATGCCCTCGAAAAGCTATG-۳'	۱۵۷۳-۱۵۵۳
	معکوس	۵'-TGACGCATTGTTAAGGCTTCT-۳'	۱۷۸۱-۱۷۶۱
GAPDH	پیشرو	۵'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-۳'	۵۹۱-۵۶۹
	معکوس	۵'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-۳'	۱۰۶۴-۱۰۳۳

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

ژن های تومورزا، محرومیت از مواد مغذی و به ویژه آسیب به DNA فعال می شود و سلول ها را به سمت آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، پیری، اتوفازی یا ترمیم DNA سوق می دهد [۳۱]. مطالعات نشان داده اند که p53 مستقیماً به پروموتور FAK متصل شده و رونویسی از آن را مهار می کند. در نتیجه، برخی داروها با تقویت این تعامل موجب مهار FAK می شوند. به علاوه، p53 می تواند به طور غیرمستقیم بیان FAK را کاهش دهد. نوع وحشی p53 رونویسی ایمنوگلوبولین های فوق خانواده ۹ (IGSF9) را فعال می کند و IGSF9 حاصل با FAK تعامل کرده و از انتقال پیام FAK/Akt در سرطان پستان جلوگیری می کند. از طرفی دیگر، در داخل هسته یکی از دامین های پروتئین FAK به نام دامین FERM مانع از فعال شدن p53 می شود، در نتیجه از آپوپتوز ذاتی سلول جلوگیری می کند [۶].

همچنین، بیان FAK به شدت توسط مکانیسم های نظارتی متعدد کنترل می شود. بیان FAK در سطح رونویسی توسط فاکتور هسته ای Nanog، NF- κ B (p50) و Argonaute2 (AGO2) از طریق اتصال به پروموتور FAK فعال می شود. علاوه بر تنظیم در سطح رونویسی، بیان FAK در سطح پس از رونویسی از طریق تغییراتی که بر پایداری mRNA و ترجمه پروتئین تأثیر می گذارند تنظیم می شود. نشان داده شده است که چندین miRNA مانند miR-7، miR-193b، miR-379-5p، miR-1298 و 543 مستقیماً بیان FAK را کاهش می دهند و به عنوان نشانگرهای زیستی پیش آگهی برای بدخیمی های انسانی در نظر گرفته می شوند [۶]. FAK باعث بقا و تکثیر سلول های توموری از طریق عملکردهای ضد آپوپتوز می شود، ولی اگر آپوپتوز به طریقی توسط عوامل خارجی یا داخلی القا شد باعث تخریب FAK توسط پروتئازهای معروف به کاسپاز، از جمله کاسپازهای ۳، ۶، ۷ و ۸ می شود [۵]؛ بنابراین از مجموع مطالب بیان شده مشخص است که مکانیسم های تنظیمی FAK متعدد و پیچیده هستند و در مورد اینکه پپتیدهای مطالعه حاضر چگونه توانستند بیان FAK را کاهش دهند می توان گفت ممکن است این پپتیدها بتوانند به طور غیرمستقیم از طریق القای آپوپتوز و

قطعات اشاره شده طولی تر از پپتیدهای مطالعه حاضر بودند، با این حال، اثر ضد توموری پپتیدهای ۹ اسید آمینه ای C و T قابل مقایسه با این پپتیدهای ۲۰ تا ۲۵ اسید آمینه ای است. البته در کنار مزیت های پپتیدهای کوتاه تر، مهم ترین عیب آن ها ممکن است نیمه عمر کوتاه تر آن ها در سرم باشد. هر چند پایداری کم را به عنوان یک عیب عمومی برای تمام پپتیدها مطرح کرده اند که می توان با استفاده از روش هایی، مانند جایگزین کردن اسید آمینه های D به جای L، حلقوی کردن و استفاده از نانوحامل ها این نقص را برطرف کرد [۱۰].

همچنین در مطالعه حاضر نشان داده شد پپتیدهای C و T به ترتیب ۶۹ و ۶۷ درصد میزان بیان ژن FAK در تومورها را در مقایسه با کنترل کاهش دادند، اما اختلاف بین اثر ۲ پپتید معنادار نبود. مطالعه حاضر در راستای مطالعه صدمماتاز و همکاران است. آن ها یک پپتید ۱۳ اسید آمینه ای طراحی کردند که از طریق مسدود کردن گیرنده های ۱ و ۲ VEGFR1 (VEGF و VEGFR2) موجب مهار رگ زایی و رشد تومور می شود. در آن مطالعه نشان داده شد دزهای ۱ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز از این پپتید می تواند به طور معنی داری موجب کاهش بیان ژن FAK در موش های دارای تومور پستان القاشده با رده سولی 4T1 شود [۲۹].

مسیر PI3K/Akt یکی از مسیرهای پیام رسانی کلیدی است که توسط کیناز چسبندگی کانونی فعال می شود و واسطه عملکردهای سلولی مختلف مانند تکثیر، بقا، مهاجرت، تهاجم و متاستاز است. هنگامی که این کیناز فعال می شود فعال سازی PI3K را تقویت می کند که فسفاتیدیل اینوزیتول تریس فسفات^{۲۹} بیشتری تولید کند و پیام رسانی مسیر پایین دست را آغاز می کند [۳۰]. کانستاتین و تومستاتین با اتصال به گیرنده در سطح سلول های سرطانی از فعال شدن مسیر FAK-PI3K/Akt جلوگیری می کنند [۱۳]. همچنین رابطه بین FAK و سرکوبگر تومور p53 یک رابطه پیچیده و معکوس است. p53 یکی از مهم ترین عوامل رونویسی، پس از قرار گرفتن در معرض استرس های بیرونی یا درونی، از جمله کمبود اکسیژن، تابش، بیان

30. Nuclear Factor κ B

29. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3)

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه یزد تصویب شد (کد اخلاق: IR.YAZD.REC.1402.058).

حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان های تأمین مالی در بخش های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد. این مقاله حاصل ۲ پایان نامه کارشناسی ارشد است که خانم ها، فاطمه زمانی و نیلوفر نعمت زاده در رشته ژنتیک در گروه زیست شناسی دانشگاه یزد آن ها را به نگارش در آورده اند.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی: ریحانه چمنی، محمد مهدی حیدری؛ تحقیق، بررسی و تحلیل آماری: فاطمه زمانی، نیلوفر نعمت زاده سوته؛ نگارش پیش نویس: ریحانه چمنی، مهری خاتمی؛ ویراستاری و نهایی سازی نوشته: محمدمهدی حیدری، علی مرادی؛ حمایت فنی یا موادی: علی مرادی؛ نظارت و مدیریت پروژه: محمدمهدی حیدری، ریحانه چمنی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از مساعدت های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه یزد در راستای انجام این پژوهش سپاس گزاریم.

فعال کردن برخی از فاکتورهای رونویسی، مانند p53 بر بیان این ژن اثر بگذارند که این فرضیه نیاز به بررسی های آزمایشگاهی دارد. در همین راستا، ما در مطالعه ای نشان دادیم یک پپتید مشتق از زنجیره $\alpha 1$ کلاژن IV که از نظر توالی به پپتیدهای مطالعه حاضر شباهت دارد، موجب افزایش بیان p53 و القای آپوپتوز در سلول های اندوتلیال و تومور شد [۳۲] و یا در مطالعه دیگری نشان داده شد پپتید C بیان ژن Bcl-2 و کاسپاز-8 را در سلول های اندوتلیال کاهش داد. همچنین موجب کاهش Bcl-2 و افزایش Bax در بافت تومور شده و به عنوان یکی از مکانیسم های ضد رگ زایی و ضد تومور، آپوپتوز را در سلول های اندوتلیال و تومور القا کرد [۳۳].

از طرفی، هرچند پروتئین های کامل تومستاتین و کانستاتین از طریق اتصال به گیرنده های اینترگرین در سطح سلول عمل می کنند، ولی مکانیسم عمل پپتیدهای کوتاه می تواند با پروتئین های بزرگ متفاوت باشد، زیرا پپتیدهای کوتاه توانایی نفوذ به داخل سلول را دارند که از آن ها با عنوان پپتیدهای نفوذ کننده به سلول یاد می شود. این پپتیدها دارای اندازه، توالی اسید آمینه ای (از باردار تا آبگریز) و بار متنوعی هستند. ۳ مکانیسم کلی برای نفوذ آن ها به داخل سلول مطرح شده است: نفوذ مستقیم در غشا، ورود به واسطه اندوسیتوز و انتقال از طریق یک ساختار گذرا [۳۴]. بنابراین درک بهتر مکانیسم عمل پپتیدهای C و T و اینکه چگونه موجب کاهش بیان FAK شدند نیازمند مطالعات عمیق تر در آینده است. از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به بررسی اثر تنها یک دز از پپتیدها و یک ژن دخیل در مکانیسم رگ زایی اشاره کرد که پیشنهاد می شود در مطالعات آینده دزهای کمتر و بیشتر از ۵ میلی گرم بر کیلوگرم در روز با تعداد نمونه های بیشتر و سایر ژن های مهم در مسیر پیام رسانی اینترگرین بررسی شوند. همچنین پیشنهاد می شود بیان آنزیم کیناز چسبندگی کانونی به روش لکه گذاری و سترن ارزیابی شود.

نتیجه گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد پپتیدهای کوتاه مهار کننده رگ زایی مشتق از کلاژن IV می توانند رشد تومور پستان را در مدل حیوانی تا ۵۰ درصد مهار کنند و موجب کاهش بیان FAK به عنوان یکی از ژن های مهم دخیل در رشد، تکثیر و متاستاز سلول های سرطانی شوند. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات قبل پیشنهاد می شود این پپتیدها به عنوان ترکیبات دارای اثرات ضد سرطانی که قابلیت استفاده در تشخیص تومور و دارورسانی هدفمند را نیز دارند، تحت بررسی های بیشتر پیش بالینی از نظر تعیین سمیت، دز بهینه، بهبود پایداری و غیره قرار گیرند. یافته های این مطالعه می تواند به طراحی داروهای پپتیدی ضد سرطان جدید کمک کند.

References

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA*. 2024; 74(1):12-49. [DOI:10.3322/caac.21820] [PMID]
- [2] Hida K, Maishi N, Matsuda A, Yu L. Beyond starving cancer: Anti-angiogenic therapy. *Journal of Medical Ultrasonics*. 2024; 51(4):605-10. [DOI:10.1007/s10396-023-01310-1] [PMID]
- [3] Ansari MJ, Bokov D, Markov A, Jalil AT, Shalaby MN, Suksatan W, et al. Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; A comprehensive review. *Cell Communication and Signaling*. 2022; 20(1):49. [DOI:10.1186/s12964-022-00838-y] [PMID]
- [4] Sarabi N, Chamani R, Assareh E, Saberi O, Asghari SM. Combination therapy in cancer: doxorubicin in combination with an n-terminal peptide of endostatin suppresses angiogenesis and stimulates apoptosis in the breast cancer. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2023; 12(2):120. [DOI:10.22088/IJMC.M.BUMS.12.2.120] [PMID]
- [5] Tan X, Yan Y, Song B, Zhu S, Mei Q, Wu K. Focal adhesion kinase: From biological functions to therapeutic strategies. *Experimental Hematology & Oncology*. 2023; 12(1):83. [DOI:10.1186/s40164-023-00446-7] [PMID]
- [6] Chuang HH, Zhen YY, Tsai YC, Chuang CH, Hsiao M, Huang MS, et al. FAK in Cancer: From mechanisms to therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(3):1726. [DOI:10.3390/ijms23031726] [PMID]
- [7] Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, et al. Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022; 7(1):48. [DOI:10.1038/s41392-022-00904-4] [PMID]
- [8] Rehanandeh M, Salehi Z, Asghari SM. [In a caspase-and caspase-9 mouse model, the effect of antiangiogenic peptides on the expression of 3 4T genes with induced breast cancer with Balb/c cell line 1 (Persian)]. *Journal of Animal Environment*. 2019; 11(4):83-8. [Link]
- [9] Kaboudan F, Talesh Sasani S, Asghari SM. [The effect of a VEGFB antagonist peptide on the expression level of miR-210 in a mouse model of breast cancer (Persian)]. *Nova Biologica Reperta*. 2021; 8(1):13-9. [DOI:10.52547/NBR.8.1.13]
- [10] Sharma K, Sharma KK, Sharma A, Jain R. Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug Discovery Today*. 2023; 28(2):103464. [DOI:10.1016/j.drudis.2022.103464] [PMID]
- [11] Bielajew BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Collagen: Quantification, biomechanics, and role of minor subtypes in cartilage. *Nature Reviews. Materials*. 2020; 5(10):730-47. [DOI:10.1038/s41578-020-0213-1] [PMID]
- [12] Okada M, Yamawaki H. A current perspective of canstatin, a fragment of type IV collagen alpha 2 chain. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2019; 139(2):59-64. [DOI:10.1016/j.jphs.2018.12.001] [PMID]
- [13] Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(39):37632-6. [DOI:10.1074/jbc.M307339200] [PMID]
- [14] Magnon C, Galaup A, Mullan B, Rouffiac V, Bouquet C, Bidart JM, et al. Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Cancer Research*. 2005; 65(10):4353-61. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-3536] [PMID]
- [15] He GA, Luo JX, Zhang TY, Hu ZS, Wang FY. The C-terminal domain of canstatin suppresses in vivo tumor growth associated with proliferation of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 318(2):354-60. [DOI:10.1016/j.bbrc.2004.04.038] [PMID]
- [16] Sudhakar A, Boosani CS. Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: Insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression. *Pharmaceutical Research*. 2008; 25(12):2731-9. [DOI:10.1007/s11095-008-9634-z] [PMID]
- [17] Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbada S, et al. Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(34):31959-68. [DOI:10.1074/jbc.M103024200] [PMID]
- [18] Eikesdal HP, Sugimoto H, Birrane G, Maeshima Y, Cooke VG, Kieran M, et al. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(39):15040-5. [DOI:10.1073/pnas.0807055105] [PMID]
- [19] Grafton KT, Moir LM, Black JL, Hansbro NG, Hansbro PM, Burgess JK, et al. LF-15 & T7, synthetic peptides derived from tumstatin, attenuate aspects of airway remodelling in a murine model of chronic OVA-induced allergic airway disease. *Plos One*. 2014; 9(1):e85655. [DOI:10.1371/journal.pone.0085655] [PMID]
- [20] Chamani R, Taleqani MH, Imanpour A, Khatami M. New insights into short peptides derived from the collagen NC1 α 1, α 2, and α 3 (IV) domains: An experimental and MD simulations study. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. 2022; 1870(4):140769. [DOI:10.1016/J.BBAPAP.2022.140769] [PMID]
- [21] Motamedi F, Khatami M, Heidari MM, Azadeh M, Karami N. Evaluation of the expression of LINCOO475 and FOXO1 genes as tumor suppressor genes in breast cancer: correlation of bioinformatics tools and experimental approaches. *Gene Reports*. 2024; 36:101980. [DOI:10.1016/J.GENREP.2024.101980]
- [22] Mohammadpanah M, Heidari MM, Khatami M, Hadadza-deh M. Relationship of hypomethylation CpG islands in interleukin-6 gene promoter with IL-6 mRNA levels in patients with coronary atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*. 2020; 12(3):214-21. [DOI:10.34172/JCVTR.2020.37] [PMID]
- [23] Kawaguchi T, Yamashita Y, Kanamori M, Endersby R, Bankiewicz KS, Baker SJ, et al. The PTEN/Akt pathway dictates the direct alphaVbeta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*. 2006; 66(23):11331-40. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-1540] [PMID]

- [24] Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, et al. Structural and antitumor properties of the YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin. *Chemistry & Biology*. 2006; 13(12):1307-15. [DOI:10.1016/j.chembiol.2006.10.007] [PMID]
- [25] He GA, Luo JX, Zhang TY, Wang FY, Li RF. Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 312(3):801-5. [DOI:10.1016/j.bbrc.2003.11.003] [PMID]
- [26] Lee E, Lee SJ, Koskimaki JE, Han Z, Pandey NB, Popel AS. Inhibition of breast cancer growth and metastasis by a biomimetic peptide. *Scientific Reports*. 2014; 4:7139. [DOI:10.1038/srep07139] [PMID]
- [27] Barbhuiya MA, Mirando AC, Simons BW, Lemtiri-Chlieh G, Green JJ, Popel AS, et al. Therapeutic potential of an anti-angiogenic multimodal biomimetic peptide in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8(60):101520-34. [DOI:10.18632/oncotarget.21148] [PMID]
- [28] Koskimaki JE, Karagiannis ED, Tang BC, Hammers H, Watkins DN, Pili R, et al. Pentastatin-1, a collagen IV derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model. *BMC Cancer*. 2010; 10:29. [DOI:10.1186/1471-2407-10-29] [PMID]
- [29] Sadremomtaz A, Kobarfard F, Mansouri K, Mirzanejad L, Asghari SM. Suppression of migratory and metastatic pathways via blocking VEGFR1 and VEGFR2. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*. 2018; 38(5-6):432-41. [DOI:10.1080/10799893.2019.1567785] [PMID]
- [30] Schlaepfer DD, Ojalil M, Stupack DG. Focal adhesion kinase signaling-tumor vulnerabilities and clinical opportunities. *Journal of Cell Science*. 2024; 137(14):jcs261723. [DOI:10.1242/jcs.261723] [PMID]
- [31] Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews. Cancer*. 2020; 20(8):471-80. [DOI:10.1038/s41568-020-0262-1] [PMID]
- [32] Chamani R, Saberi O, Fathinejad F. An arresten-derived anti-angiogenic peptide triggers apoptotic cell death in endothelial cells. *Molecular Biology Reports*. 2024; 51(1):513. [DOI:10.1007/s11033-024-09448-y] [PMID]
- [33] Chamani R, Zamani F. Novel anti-angiogenic peptide derived from canstatin induces apoptosis in vitro and in vivo. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2022; 28(5):149. [DOI:10.1007/s10989-022-10458-2]
- [34] Gori A, Lodigiani G, Colombaroli SG, Bergamaschi G, Vitali A. Cell Penetrating Peptides: Classification, mechanisms, methods of study, and applications. *ChemMedChem*. 2023; 18(17):e202300236. [DOI:10.1002/cmdc.202300236] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank