مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه ی فعالیت ضد سرطانی بروینین-۲R بر روی رده سلولی سرطان معده

رباب حسن وند جمادی[۱*]، اسداله اسدی[۲]، مهدی حسن وند جمادی[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران
۲- دکترای بیوفیزیک، استادیار ، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اردبیل، ایران
۳-دانشجوی کارشناسی ارشد آب و فاضلاب، دانشگاه صنعت آب و برق شهید عباسپور، دانشکده ی آب و محیط زیست، گروه مهندسی آب و فاضلاب، تهران، ایران

چکیده

سابقه وهدف: سرطانهای معدی-رودی از جمله فراوانترین سرطانهایی است که در سراسر جهان رخ می دهد. علت این تومورها می تواند فاکتورهای محیطی و وراثتی باشد. آدنوکارسینومای معده رایجترین نوع سرطان معده است. بروینین- ۲R پپتیدی جدید با خواص ضد میکروبی وضد سرطانی است که ازترشحات پوستی قورباغه های خانواده Ranaبدست میآید و دارای ۲۵ آمینو اسید بوده وکاتیونی می باشد، فعالیت همولیتیک پایینی برروی اریتروسیتها نشان میدهد.دراین مطالعه غلظت های مختلف پپتید بروینین-۲R روی سلولهای کارسینومای معده انسانی (AGS) اثر داده شد.

مواد و روش: رده سلولی AGS با غلظتهای مختلف پپتیددر بازه های زمانی متفاوت تیمار شد و سمیت پپتید و زیستایی سلولها بوسیله ی سنجش MTT(دیمتیل تیازول دی فنیل هیدروژن تترازولیوم بروماید) بررسی گردید. آزمایش سه بار تکرار شد که میانگین مقادیر بدست آمده نشان داده شده است.

یافته ها: براساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت و همچنین مدت زمان تیمار سلولهای AGS با پپتید بروینین-R۲ درصد سلولهای زنده باقیمانده بسیار کاهش یافته بودند.

نتیجه گیری: به دلیل اثر همولیتیک جزئی، این پپتید نمونه خوبی درطراحی دارو به شمار می رود. این پپتید مرگ سلولی شامل فعالسازی اتوفاژی را راه اندازی می کند و بر علیه رده های سلولی بدخیم AGS فعالیت ضد سرطانی نشان می دهد.

کلمات کلیدی: بروینین-۲R، کارسینومای معده انسانی، سمیت پپتید، زیستایی؛

مقدمه

سرطانهای معدی-روده ای از جمله فراوانترین سرطانهایی است که در سراسر جهان رخ می دهد. علت این سرطانها می تواند فاکتورهای محیطی و وراثتی باشد. فاکتورهای زندگی مثل عادات غذایی، تحرک فیزیکی، مصرف الکل، مصرف دخانیات و بروز عفونت می تواند نقش مهمی در ایجاد این نوع سرطانها بازی کند (۴و۱۳).

سرطان معده

سرطان معده حدود ۵۰٪ از کل سرطانهای گوارشی را در بر می گیرد. سرطان معده بر اساس معیار های آناتومیک و هیستولوژیک ممکن است به سه نوع نزدیک مبدا، پراکنده و دور از مبدا تقسیم شود که هر نوع ویژگیهای منحصربفردی دارد. چندین نوع مختلف سرطان می تواند در معده ایجاد شود، رایجترین نوع، آدنوکارسینوما نامیده می شود که از یک نوع سلول معمولی آستری معده شروع می شود. آدنوکارسینومای معده رایجترین نوع سرطان معده است (۱). آدنوکارسینومای معده در مردان بالای ۴۰ سال به وفور دیده می شود. بررسی های اخیر نشان می دهد شیوع بالای عفونت H.pylori، رژیم غذایی پرنمک و دخانیات فاکتورهای اصلی سرطان معده در ایران می باشند (۱۱). اخیرا پیشرفتهای زیادی در درمان سرطان

آدرس نویسنده مسئول : اردبیل- شهرک نیستان- کوچه ۱۰-پلاک ۳۳۴

Email : robab.hasanvand@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۴/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.13.7]

معده حاصل شده اما درمان سرطان معده هنوز به عنوان چالشی مهم باقی است (۱۴و۷).

پپتید درمانی

بروینین-۲R نانو پپتیدی با خواص ضدمیکروبی و ضدسرطانی است که برعلیه باکتری های گرم مثبت ومنفی و برخی سرطانها فعال است. این پپتید، کاتیونی بوده و ۲۵ آمینواسید دارد، از ترشحات پوستی قورباغه های خانواده Ranaبدست می آید و فعالیت همولیتیک پایینی برروی اریتروسیتها نشان می دهد. به دلیل اثر همولیتیک جزئی، این پپتید نمونه خوبی در طراحی دارو به شمار می رود (۱۰و۸). برخی از پپتیدهای آنالوگ بروینین -۲R،خانوادهبروینین-۱، بروینین-۲، اسکولنتین-۲ و تمپورین می باشند که از ترشحات پوستی گونه ای ازقورباغه به دست می آیند(۲). این پپتیدها نیز فعالیت ضدمیکروبی داشته و برای جانور کاربرد دفاعی دارند(۶). بروینین-۲R برای اولین بار توسط آقای آسوده و همکارانش از ترشحات پوستی قورباغه مردابی معمولی *Rana ridibunda*جدا گردید (۸). محل پیدایش این گونه بیشتر در ساحل شمالی دریای خزر و روسیه است. این پپتید حاوی ۲۵ آمینواسید می باشد. ازلحاظ خصوصیات ساختاری این پپتید دارای انتهای آمینو آب دوست وانتهای کربوکسیل آن دارای لوپ است که توسط یک پیوند دی سولفیدی ایجاد شده است، این ساختار در گونه های Rana مشترک است.

مواد وروش ها

تهیه محلول MTT

۵۰ میلی گرم پودر MTT (مرک، آلمان) را در ۱۰ میلی لیتر PBS حل و فیلتر می کنیم. محلول حاصل باید در شرایط تاریکی نگهداری شود.

کشت و تیمار سلول سرطانی رده AGS

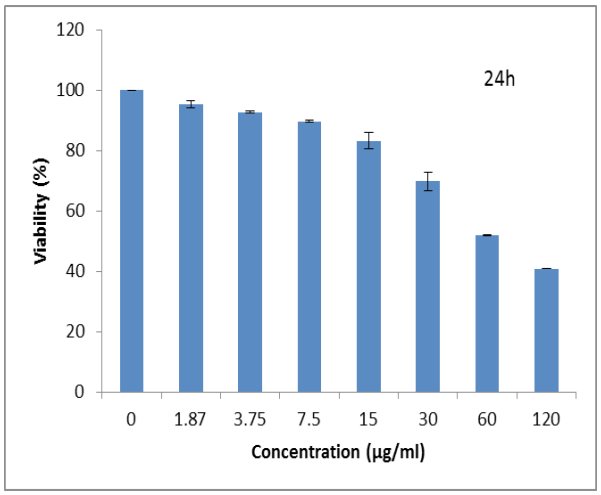
سلول سرطانی معده (AGS) در فلاسک کشت سلول کشت داده شد و برای رسیدن به رشد کافی در انکوباتور قرار گرفت. در مرحله بعد سلولها به روش رنگ آمیزی با تریپان بلو شمارش و به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای منتقل شدند و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه گردیدند. بعد از این مدت، رقتهای سریالی از پپتید بروینین-۲R به همراه محیط کشت جدید به چاهکهای حاوی سلول اضافه شدند؛ در یک چاهک دارای سلول پپتیدی افزوده نشد و به عنوان کنترل نگه داشته شد. پلیت ها به مدت ۲۴و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند؛ بعد از سپری شدن زمانهای تیمار، از انکوباتور خارج شده و محیط چاهکها حذف گردید. در این مرحله به هر چاهک محیط کشت به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان، محیط چاهکها مجددا حذف گردید و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدسپس جذب آن با دستگاه الایزا در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید.

نتایج

نتایج نشان دادندکه مورفولوژی سلولهای رده سرطان معده (AGS) براثرتیمارباپپتیددچار تغییراتی میگردد.

سنجشاثرسیتوتوکسیکپپتیدبروینین-R۲ بر روی سلول های AGS

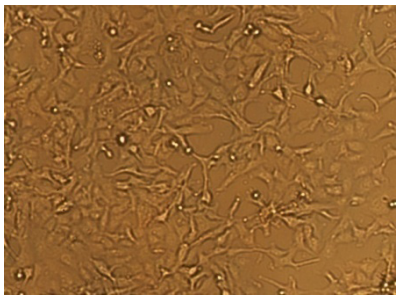
اثر سیتوتوکسیکپپتیدبروینین-R۲ بر روی سلولهای AGS درنسبتهای مختل فدز- زمان به روش سنجشMTT بررسی ونتایج درنمودارهای زیر نشان داده شده است. براساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت و همچنین مدت زمان تیمار سلولهای AGS با پپتیدبروینین-R۲ درصد سلولهای زنده باقیمانده کاهش چشمگیری را از خود نشان دادند.



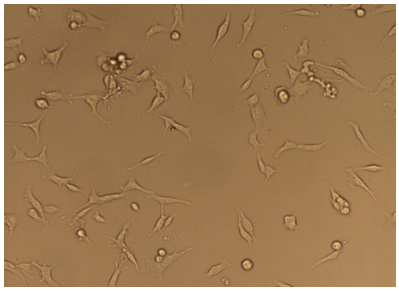
شکل۱. نمودارهای تاثیرغلظت های مختلف پپتیدبروینین-۲Rبرروی رشدسلولهایAGS درزمانهای۲۴ و۴۸ ساعت؛ (نتایج برحسب درصدسلول های زنده نسبت‌کنترل)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.13.7]



سلولهای AGS کنترل



سلولهای AGS تیمار با بروینین-۲R

شکل۲. تصویر مقایسه ای بین سلولهای تیمار شده وکنترل

بحث

اگرچه چندین دهه از مطرح شدن پپتیدها به عنوان دارو می گذرد، اما عوامل مختلفی مانند هضم پپتیدها توسط آنزیم های مختلف مانند پروتئازها، کندی سرعت انتقال این نوع داروها از غشاء و انعطاف پذیری بالای آنها محدودیت هایی را در استفاده از آنها به وجود آورده است که مانع گسترش مصرف آنها در میان بیماران می شود. علاوه بر این، پپتیدها ترکیباتی هیدرفیلیک یا آب دوست هستند و نمی توانند از مانع مغزی خونی عبور کنند(۳و۵). با این حال، بسیاری از محققان با توجه به این که پپتیدها از فعالیت زیستی بالایی برخوردار بوده و هزینه درمانی بسیار کمتری را به بیمار تحمیل می کنند این ترکیبات را کاندیداهای خوبی برای سنتز داروها می دانند. یکی دیگر از مهم ترین مزایای پپتیدها به عنوان دارو این است که معمولاچنین داروهایی عوارض جانبی نداشته و به علت داشتن سمیت پایین، مشکلی را برای بیمار به وجود نخواهند آورد (۳). اثرسیتوتوکسیک پپتیدبروینین-R۲ بر روی رده سلولی AGS درنسبتهای مختلف دز-زمان به روش سنجشMTT بررسی شد؛ براساس نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت ومدت زمان تیمار رده سلولی AGS با پپتید بروینین-R۲، درصد سلولهای زنده باقیمانده کاهش یافتند.

درمقایسه باسلولهای طبیعی یوکاریوت، سلولهای سرطانی دارای ۹٪-۳ فسفاتیدیل سرین بیشتری درسطح خود هستند (۱۲و۹). این عامل به انتخابی بودن برهمکنش بروینین۲-R با سلولهای سرطانی درمقایسه با سلولهای طبیعی می افزاید.

تشکر و قدردانی

از زحمات و تلاش های بی وقفه ی استاد راهنمای بزرگوارم آقای دکتر اسداله اسدی سپاسگذارم. از همکاری صمیمانه ی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی کمال تشکر را دارم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.13.7]

منابع

1. Albert S.R., Cervantes A, and van de Velde C.J., Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. Ann Oncol. 2003; 31-6.
2. ConlonJ. M, AhmedE,Condamine E. Antimicrobial Properties of Brevinin-2-Related Peptide and its Analogs: Efficacy against Multidrug-Resistant Acinetobacterbaumannii. ChemBiol Drug Des 2009; 488–493.
3. Ehrenstein G. and Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. Q Rev Biophys. 1977; 1–34.
4. Kelsen, D. P., Daly, J. M., Kern, S. E., Levin, B., Tepper, J. E., & Van Cutsem, E. (eds.). Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology.(2nd Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008; 581-615.

5. Kwon, M. Y., Hong, S. Y. and Lee, K. H. Structure-activity analysis of brevinin1E amide, an antimicrobial peptide from Rana esculenta. Biochem Biophys Acta.1998; 239–248.

6. Liu X, Liu R, Wei L, Yang H, Zhang K, Liu J and Lai R. Two novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, Rana nigrovittata.2011; 68-72.

7. Moehler, M., et al., The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Multimodal treatment of gastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2007; 965-81.
8. Naderi-manesh H., Asoodeh. S. Ghavami A., Klonisch. T,. Los M. Andrew J.H., Kamran K., Tadeusz J.K., Spencer B.G, Evan P.B. Brevinin-2R semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway, J. Cellular. Mol Medicine. 2007; 1005-1022.
9. Oren Z, Hong J &Shai Y. A., repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. J. Biol. Chem. 2004; 14643–9.
10. Pourfarzi, F., et al., The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. Int J Cancer, 2009; 1953-60.
11. Purfarzi, F., etal., The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. Int J cancer, 2009; 1953-60.

12. Risso, A., Braidot, E., Sordano, M.C., Vianello, A., Macri, F., Skerlavaj, B., Zanetti M., Gennaro R., &Bernardi P. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. Mol and Cell Biol, 2002; 1926–35.

13. Taghavi, N., et al., Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: a sub site analysis of 761 cases. World J Gastroenterol, 2007; 5367-70.
14. Wong, R. and D. Cunningham, Optimizing treatment regimens for the management of advanced gastric cancer. Ann Oncol, 2009; 605-8.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.13.7]