

## بررسی اثر کشندگی پپتید برونین-2R بر سلول‌های اسکواموس کارسینوم دهانی

دکتر فائزه خزیمه<sup>۱</sup>، دکتر زهرا گلستان نژاد<sup>۲</sup>، دکتر عزیزالله باختری<sup>۳</sup>، دکتر مهین بخشی<sup>۴</sup>، هژیر یوسف شاهی<sup>۵</sup>،

شاهین گوانجی<sup>۶</sup>

نویسنده‌ی مسوول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان shahin.Gavanji@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۳/۳۱ پذیرش: ۹۵/۱/۲۲

### چکیده

**زمینه و هدف:** اخیراً استفاده از پپتیدهای دارویی جهت ساخت داروهای نوین مورد توجه می‌باشد. از این میان نانو پپتید برونین-2R دارای طیف وسیعی از عملکردهای زیستی می‌باشد. بر این اساس این مطالعه با هدف بررسی اثر برونین-2R بر روی سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) در مقایسه با سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) در شرایط *In vitro* انجام گرفت. **روش بررسی:** در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) و رده‌ی سلول طبیعی فیبروبلاست موش (L929) به‌عنوان شاهد کشت شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پپتید برونین-2R (۱/۰ تا ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. میزان زنده بودن سلول‌ها به روش *MTT* تعیین گردید. سپس داده‌ها با نرم افزار *SPSS* نسخه ۲۰ به روش *one way ANOVA* و توکی مورد آنالیز قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان غلظت کشندگی ۵۰ درصدی (*IC50*) در این مطالعه برای پپتید برونین-2R بر دو رده‌ی سلولی *KB* و *L929* به‌ترتیب برابر با ۱۵/۴۸ و ۲۴/۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. نسبت *IC50* رده *L929* به *IC50* سلول اسکواموس کارسینوم دهانی برابر با ۱/۵۶ می‌باشد که نشان از نیاز بیشتر غلظت برونین-2R به میزان تقریباً ۱/۵ برابر برای مشاهده اثر کشندگی ۵۰ درصدی روی سلول *L929* نسبت به رده‌ی سلولی *KB* دارد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که پپتید برونین-2R دارای اثر سمیت سلولی بیشتری بر روی سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) نسبت به سلول‌های طبیعی فیبروبلاست موش (*L929*) می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** برونین-2R، کشندگی سلولی، اسکواموس سل کارسینوم دهانی، پپتید درمانی

۱- متخصص بیماری‌های دهان و دندان، دانشیار گروه بیماری‌های دهان فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

۲- متخصص بیماری‌های دهان و دندان، استادیار گروه بیماری‌های دهان فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

۳- دکترای ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

۴- متخصص بیماری‌های دهان و دندان، دانشیار گروه بیماری‌های دهان فک و صورت، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۵- دانشجوی دندانپزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

۶- مهندسی گیاه پزشکی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان

## مقدمه

استفاده از پپتیدهای دارویی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱ و ۲). داروهای مختلف مشتق شده از پپتید، ۱۰ تا ۴۰ آمینو اسید دارند (۳ و ۴). بروینین-2R، پپتیدی ۲۵ آمینواسیدی دوگانه دوست و یک ماده‌ی دفاعی غیر همولیتیک است که اولین بار از پوست قورباغه‌ی تالابی ژاپن *Rana brevipoda porsa* جداسازی شده است (۵ و ۶). سه پپتید دارویی بروینین دارای انواع مختلفی می‌باشند (۶). این پپتیدها ساختار آمفی پاتیک داشته و انتهای آمینو آنها آب دوست می‌باشد (۷-۹). این پپتید دارای طیف وسیعی از عملکردهای زیستی از جمله خاصیت ضد توموری و ضد میکروبی می‌باشد (۱۰ و ۱۱).

از میان بدخیمی‌ها، اسکواموس سل کارسینوما سر و گردن، از لحاظ شیوع هشتمین بدخیمی می‌باشد. این بدخیمی دارای منشا اپی‌تلیال بوده که در اثر موتاسیون‌های ژنی به دلیل ناپایداری ژنتیکی و فاکتورهای محیطی ایجاد می‌گردد. بیش از ۹۰ درصد بدخیمی‌های دهان کارسینوما سلول سنگفرشی (SCC) است (۱۲-۱۴). روش‌های درمان استاندارد این بدخیمی عبارتند از: شیمی درمانی و جراحی و رادیوتراپی (۱۵). این روش‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر باعث افزایش طول عمر افراد مبتلا می‌گردد (۱۶-۱۸). قابل ذکر بوده که، استفاده از این درمان‌ها باعث بروز عوارض جانبی شدید حتی در بعضی موارد منجر به محدودیت ادامه درمان می‌گردد. با توجه به موارد مذکور مطالعات بر روی ترکیباتی با خاصیت ضد سرطانی هدفمند (علیه سلول‌های توموری نه همه سلول‌های بدن) صورت گرفته است (۱۹). از میان این ترکیبات می‌توان به Brevini-2R اشاره نمود (۱۱)، بر این اساس این مطالعه با هدف بررسی اثر بروینین-2R بر روی سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (SCC) در مقایسه با سلول‌های طبیعی فیروپلاست (L929) در شرایط *In vitro* پرداخته است.

## روش بررسی

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بوده و در محیط *Invitro* انجام گرفت. سلول‌های اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) و رده‌ی سلول طبیعی فیروپلاست موش (L929) به‌عنوان شاهد از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. پپتید بروینین-2R از موسسه تحقیقات طب سنتی ایران با شماره‌ی A-۸۳۴۷۶۵۳ (KLKKNFAKGVAQSLLNKASCKLSGQC) تهیه گردید. دو رده‌ی سلولی از تانک ازت خارج و مرحله‌ی یخ زدایی سلول‌ها انجام شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (SIGMA, USA) غنی شده همراه با ۱۰ درصد (Gibco) Fetal Bovine Serum و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Gibco) در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (۵ درصد) با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و میزان RH=۱۰۰ رشد داده شدند. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی برای اطمینان از درصد بالای سلول‌های زنده در حال رشد تست *Viability* با رنگ تریپان بلو محاسبه شد که درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۰ درصد به دست آمد (۲۰).

**آزمایش MTT:** جهت سنجش میزان بقای سلولی از روش رنگ‌سنجی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) استفاده شد (۲۱ و ۲۲). در این تست فعالیت سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده، محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند و میزان کریستال‌های نامحلول فورمازان را پس از حل کردن آن در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) با دستگاه الیزا ریدر سنجش می‌نمایند. به‌منظور انجام این تست ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی  $5 \times 10^4$  سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در میکرو پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پپتید بروینین-2R (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۴، ۲۶، ۲۸ و ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که با روش رقیق سازی سریالی تهیه شده بود

توموری به صفر می‌رسد. در ۲۴ ساعت دوم اثر معنی‌دار این نانوپیتید بر کشندگی از غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع می‌شود و در غلظت ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنده ماندن سلول توموری به صفر می‌رسد. در ۲۴ ساعت سوم اثر معنی‌دار این نانوپیتید بر کشندگی از غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع می‌شود و در غلظت ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنده ماندن سلول بدخیم به صفر می‌رسد (جدول ۱). برای سلول‌های طبیعی در ۲۴ ساعت اول اثر معنی‌دار این نانوپیتید بر کشندگی سلول از غلظت ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع می‌شود و در غلظت ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر قدرت کشندگی سلول طبیعی به حداکثر می‌رسد. در ۲۴ ساعت دوم و سوم اثر معنی‌دار این نانوپیتید بر کشندگی از غلظت ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع می‌شود و در غلظت ۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر قدرت کشندگی سلول طبیعی به حداکثر می‌رسد.

حروف متفاوت در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌داری در سطح ( $P < 0/0001$ ) دارد. نمودارهای درصد سلول‌های زنده پس از قرار گیری در معرض غلظت‌های مختلف پیتید برونین-2R به تفکیک زمان (ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲) در سه نمودار زیر آورده شده است. در ۲۴ ساعت اول و آنالیز t-test مستقل نشان داد که تا غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوتی بین درصد سلول‌های زنده دو رده سلولی مورد آزمایش ناشی از تیمار با پیتید برونین-2R وجود ندارد اما از غلظت ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بین دو رده سلولی در واکنش به این پیتید تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P = 0/0001$ ). در غلظت ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر دوباره درصد زنده ماندن دو رده سلولی بدخیم و طبیعی پس از تیمار با این نانو پیتید یکسان می‌گردد (نمودار ۱).

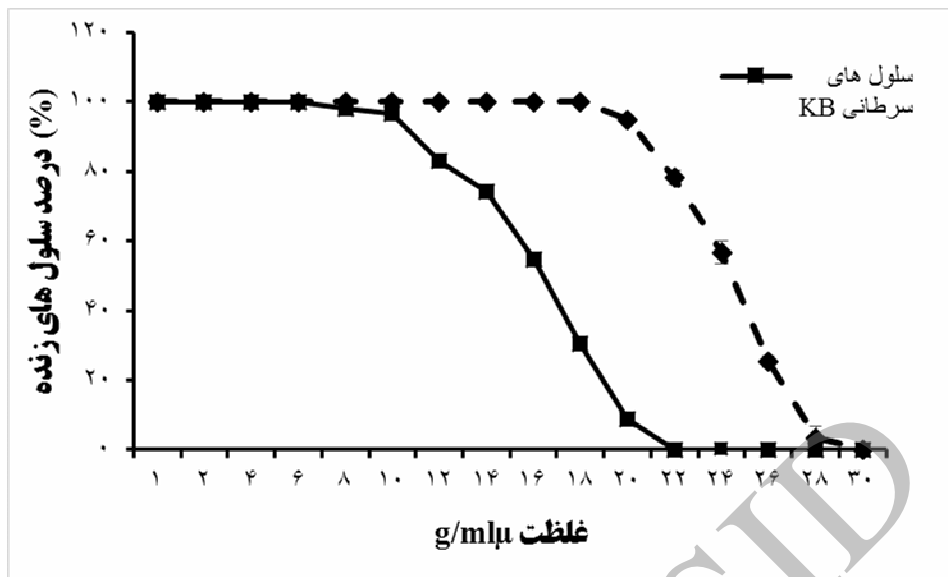
به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مذکور و به ازای هر ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر خانه از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس به هر خانه از پلیت بافر گلاسیسین و DMSO اضافه شد. بعد از آن که ذرات رنگ بخوبی حل شدند، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط ELISA Microplate Reader خوانده شد (۲۳). درصد سلول‌های زنده باقیمانده در غلظت‌های مختلف پیتید در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای هر رده سلولی با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ به روش one way ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت. مقایسه‌ی میانگین غلظت‌های موثر در کشتن سلول بدخیمی (KB) و فیروبلاست (L929) به روش توکی صورت گرفت. مقایسه‌ی درصد زنده ماندن دو رده سلولی در غلظت‌های مشابه از پیتید برونین-2R با استفاده از آزمون t مستقل مورد آزمون قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار گزارش گردید.

### یافته‌ها

در جدول ۱ اثر غلظت‌های مختلف پیتید برونین-2R بر درصد سلول‌های زنده رده اسکواموس (KB) و رده فیروبلاست (L929) در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ گزارش شده است. نتایج نشان داد با افزایش غلظت پیتید اثر کشندگی آن بر هر دو رده سلول افزایش می‌یابد ( $P < 0/0001$ ). در این مطالعه از غلظت‌های ۰/۱ تا ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اثر کشندگی در هر دو رده سلولی سلول بدخیمی (KB) و فیروبلاست (L929) مشاهده نشد ولی از غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بعد اثر کشندگی مشاهده شد. در ۲۴ ساعت اول اثر معنی‌دار این نانوپیتید بر کشندگی سلول‌های توموری از غلظت ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر شروع می‌شود و در غلظت ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنده ماندن سلول

جدول ۱: میانگین درصد سلول‌های زنده‌ی رده‌ی سلولی تواموری (KB) و رده‌ی سلول طبیعی (L929) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف پیتید بروینین-2R

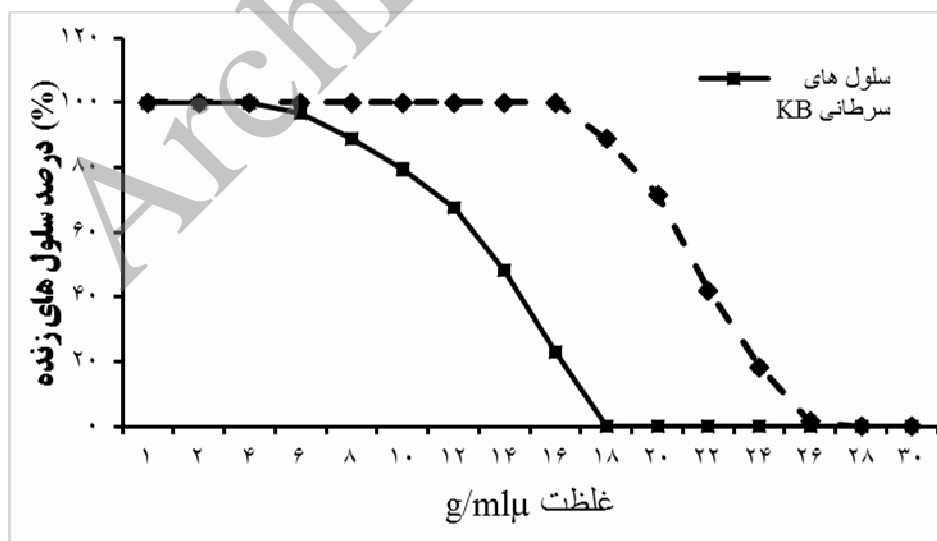
بروینین (µg/ml)	سلول‌های سرطانی			L929 سلول‌های		
	Mean±SE			Mean±SE		
	۲۴	۴۸	۷۲	۲۴	۴۸	۷۲
۴	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۶	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۹۶/۶۷±۱/۰ <sup>a</sup>	۹۱/۶۰±۰/۶ <sup>b</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۸	۹۸/۲۳±۱/۷ <sup>a</sup>	۸۸/۷۰±۰/۵ <sup>b</sup>	۸۳/۴۰±۰/۹ <sup>c</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۱۰	۹۶/۶۷±۰/۴ <sup>a</sup>	۷۹/۳۷±۲/۰ <sup>c</sup>	۷۴/۶۳±۲/۲ <sup>d</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۱۲	۸۳/۱۰±۰/۸ <sup>b</sup>	۶۷/۵۰±۱/۰ <sup>d</sup>	۶۲/۴۳±۱/۳ <sup>e</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۱۴	۷۴/۲۳±۰/۸ <sup>c</sup>	۴۸/۴۰±۰/۶ <sup>e</sup>	۴۳/۵۳±۱/۷ <sup>f</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>
۱۶	۵۴/۷۳±۰/۶ <sup>d</sup>	۲۲/۹۳±۱/۷ <sup>f</sup>	۱۶/۲۳±۲/۱ <sup>g</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۹۷/۵۷±۰/۲ <sup>a</sup>
۱۸	۳۰/۴۰±۰/۵ <sup>e</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۸۸/۸۷±۱/۹ <sup>b</sup>	۸۳/۴۶±۱/۶ <sup>b</sup>
۲۰	۸/۸۰±۱/۰ <sup>f</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۹۴/۸۰±۱/۴ <sup>a</sup>	۷۱/۷۰±۰/۹ <sup>c</sup>	۶۲/۹۰±۱/۵ <sup>c</sup>
۲۲	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۷۸/۱۷±۱/۹ <sup>b</sup>	۴۲/۱۰±۱/۱ <sup>d</sup>	۳۷/۵۱±۱/۴ <sup>d</sup>
۲۴	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۵۶/۷۰±۳/۳ <sup>c</sup>	۱۸/۳۳±۱/۶ <sup>e</sup>	۱۳/۵۴±۱/۶ <sup>e</sup>
۲۶	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۲۵/۳۰±۱/۵ <sup>d</sup>	۱/۶۷±۱/۶ <sup>۷</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>f</sup>
۲۸	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۳/۳۳±۳/۳ <sup>c</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>f</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>f</sup>
۳۰	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>g</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>h</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>e</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>f</sup>	۰/۰±۰/۰ <sup>f</sup>



نمودار ۱: درصد سلول‌های زنده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف برونین-2R در 24 ساعت اول

به‌طور معنی‌داری کمتر از درصد سلول‌های زنده‌ی رده‌ی سلولی طبیعی است ( $P=0/0001$ ). در غلظت 26 میکروگرم بر میلی‌لیتر دوباره دو رده‌ی سلولی از نظر میزان زنده ماندن پس از تیمار با پپتید برونین یکسان می‌گردند (نمودار ۲).

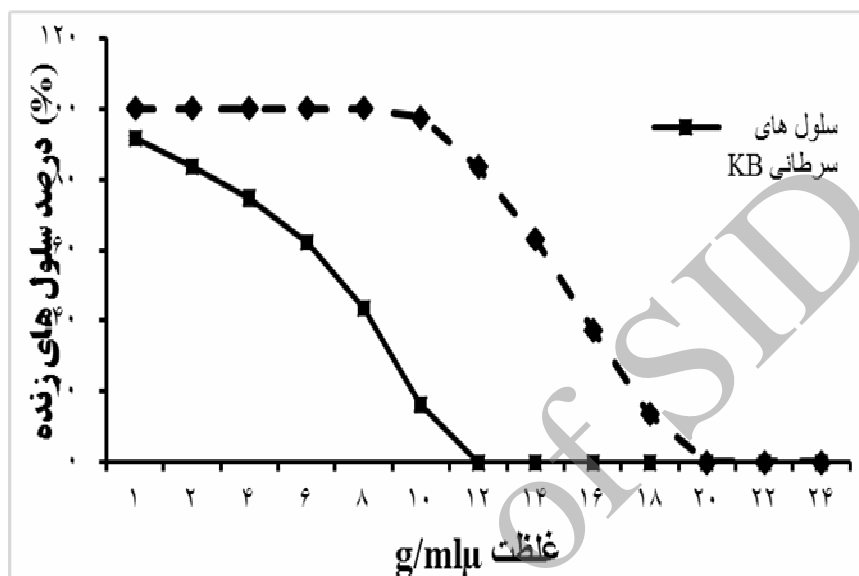
پس از 48 ساعت تا غلظت 6 میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوتی بین درصد سلول‌های زنده‌ی دو رده‌ی سلولی مورد آزمایش ناشی از تیمار با این پپتید وجود ندارد و اما از غلظت 8 میکروگرم بر میلی‌لیتر درصد سلول‌های زنده‌ی رده‌ی سلولی اسکواموس در واکنش به پپتید برونین



نمودار ۲: درصد سلول‌های زنده پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف برونین-2R پس از 48 ساعت

بروینین تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در غلظت ۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر دوباره دو رده‌ی سلولی از نظر زنده مانی با تیمار با این نانو پپتید یکسان می‌گردند (نمودار ۳).

پس از ۷۲ ساعت تا غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوتی بین دو رده‌ی سلولی ناشی از تیمار با این نانوپپتید وجود ندارد اما از غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح ۰/۰۰۰۱ بین دو رده‌ی سلولی در واکنش به نانوپپتید



نمودار ۳: درصد سلول‌های زنده پس از قرار گیری در معرض غلظت‌های مختلف بروینین-2R پس از ۷۲ ساعت

معادله مطابق جدول ۲ محاسبه شد. در جدول ۲ معادلات ارائه شده، معادلات رگرسیون خطی است.

میزان IC50 در این مطالعه برای بروینین-2R، بر روی هر دو رده‌ی سلولی KB و L929 در ۲۴ ساعت ابتدایی با استفاده از

جدول ۲: میزان IC50 و R<sup>2</sup> در این مطالعه برای بروینین-2R بر روی هر دو رده‌ی سلولی KB و L929

معادله‌ی سلول‌های سرطانی برای محاسبه IC50	معادله‌ی سلول‌های نرمال برای محاسبه IC50
IC = ۱۵۷ - ۶/۹۱X	IC = ۲۸۱ - ۹/۵۷X
X = غلظت بروینین	X = غلظت بروینین
R <sup>2</sup> = ۹۳/۳%	R <sup>2</sup> = ۹۶/۰%

R<sup>2</sup> معیاری از مناسب بودن مدل برای برآورد زنده مانی بر اساس غلظت می‌باشد که هرچه به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد بهتر است.

نانوپپتید بروینین-2R را قرار دهیم که در مطالعه آن غلظت را بررسی نکرده باشیم، این معادله میزان زنده ماندن سلول مورد نظر را در آن غلظت پیش‌بینی خواهد نمود. با توجه به این معادله غلظت موثر که در آن ۵۰ درصد رده‌ی سلولی

بر اساس این مطالعات که به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ به دست آمده، می‌توان به ازای هر غلظت به‌کار رفته از نانو پپتید بروینین-2R میزان زنده ماندن سلول طبیعی و یا بدخیمی را به دست آورد. اگر به‌جای ایکس، غلظتی از

L929 به ترتیب برابر با ۱۵/۴۸ و ۲۴/۱۴ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نسبت IC50 سلول طبیعی (L929) به IC50 سلول توموری (KB) برابر با ۱/۵۶ به دست آمد در مطالعه ای قوامی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر پپتید برونین-2R را بر روی رده های سلولی سرطان خون، بدخیمی کلون، پستان و ریه مورد بررسی قرار دادند که میزان (IC50=غلظت پپتید برونین-2R که سبب مرگ ۵۰ درصد سلول ها می شود) بر روی رده های سلولی سرطانی پستان (MCF-7) بین ۱۰ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر، رده ی سلولی لوکمیایی (BJAB) بین ۳۰ تا ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و سلول طبیعی فیروبلاست موش (L929) بین ۲۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمده است (۱۱). مقایسه ی نتایج این مطالعه و قوامی نشان می دهد برونین-2R دارای اثر کشندگی بر روی رده ی سلولی سرطانی پستان (MCF-7) در غلظتی مشابه با این تحقیق است، ولی در این مطالعه پپتید برونین-2R با غلظت کمتری دارای اثر کشندگی بر روی رده ی سلولی طبیعی (L929) نسبت به مطالعه قوامی و همکارانش بود (۱۱). در تحقیق دیگری که توسط حسنونند جمشیدی در سال ۲۰۱۴ انجام شد، اثر برونین-2R بر روی سلول های سرطان معده (AGS) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این تحقیق نشان داد غلظت های ۳۰ تا ۱۲۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای خاصیت کشندگی بر روی این رده سلولی بدخیم (AGS) می باشد (۱۰). مقایسه ی نتایج ما و حسنونند جمشیدی نشان می دهد که برونین-2R دارای اثر مهار کنندگی قوی تری بر روی سلول های سرطانی اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) نسبت به رده ی سلولی سرطانی معده (AGS) می باشد (۱۰).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که پپتید برونین-2R، دارای اثر کشندگی بیشتری بر روی سلول های اسکواموس سل کارسینومای دهانی ۱۵/۴۸ میکرولیتر بر کیلوگرم نسبت به

اسکواموس (KB) از بین رفتند، برابر با ۱۵/۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر = IC50 و برای رده ی سلولی فیروبلاست (L929) میزان IC50 برابر با ۲۴/۱۴ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. نسبت IC50 سلول طبیعی (L929) به IC50 سلول توموری (KB) برابر است با ۱/۵۶ = ۲۴/۱۴/۱۵/۴۸ که نشان از نیاز بیشتر غلظت برونین-2R به میزان تقریباً ۱/۵ برابر برای مشاهده ی اثر کشندگی ۵۰ درصدی روی سلول طبیعی (L929) نسبت به رده سلولی توموری (KB) دارد.

### بحث

پپتیدها رشته های کوتاهی هستند که از به هم پیوستن آمینو اسیدها با ترتیب مشخصی تشکیل شده اند. اولین بار در علم پزشکی خاصیت ضد میکروبی پپتید برونین-2R بر روی سویه های پاتوژن بیماری زا کشف شد، سپس نتایج مختلف نشان داد که برونین-2R دارای اثرات سمیت سلولی بهتر بر روی سلول های توموری است. این عامل را می توان به خاصیت کاتیونیک و آمفی پاتیک برونین-2R مرتبط دانست (۲۸-۲۴ و ۲). بررسی مکانیسم برونین-2R بر روی رده های سلولی بدخیم نشان می دهد که این پپتید در مرحله ی نخست به دیواره ی سلول توموری متصل می شود و بر روی چرخه ی سلولی تاثیر می گذارد (۳۰ و ۲۹). نتایج تحقیقی که توسط پاپو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی اثر برونین-2R بر روی سلول های توموری در موش انجام شد و نشان داد که نوع اسید آمینه در بدنه اصلی پپتید می تواند در اثر ضد سرطانی این ماده ی دارویی موثر باشد، به طوری که وجود اسید آمینه لوسین (Leu) از نوع D و L، لیزین (Lys) و آرژنین (Arg) در مکانیسم ضد توموری و ضد میکروبی این پپتید دارویی موثر می باشد (۳۰). نتایج مطالعه ی ما نشان داد که برونین-2R دارای اثر مهار کننده بر روی سلول های بدخیم اسکواموس سل کارسینوم دهانی (KB) می باشد و میزان IC50 برای برونین-2R، بر روی هر دو رده ی سلولی KB و

پایینی بر روی سلول‌های سالم می‌باشد. این گونه اثر بخشی بر روی سلول‌های فیروپلاست مطرح کننده احتمال بروز عوارض جانبی پایین‌تر در حین استفاده بالینی این پپتید می‌باشد. بدین منظور انجام مطالعات تکمیلی به‌ویژه کارآزمایی‌های بالینی توصیه می‌گردد.

سلول‌های طبیعی فیروپلاست موش ۰/۱۴ میکرولیتر بر کیلوگرم ۲۴ می‌باشد. با توجه به این موضوع که غلظت کشندگی بر روی سلول‌های سرطانی پایین‌تر می‌باشد می‌توان این ماده را به‌عنوان دارویی پیشنهادی به‌عنوان درمان کمکی برای بیماران مبتلا به اسکواموس سل کارسینومای دهانی مطرح نمود، که ضمن اثر بخشی دارای عوارض ناخواسته

## References

- 1- Ali MF, Knoop FC, Vaudry H, Conlon JM. Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex. *Peptides*. 2003; 24: 955-61.
- 2- Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 61-92.
- 3- Kwon MY, Hong SY, Lee KH. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1387: 239-48.
- 4- Yaghoubi H, Asef A, Banki A. Solid phase chemical synthesis and structure-activity study of brevinin-2R and analogues as antimicrobial peptides. *J Med Bacteriol*. 2013; 2: 41-53.
- 5- Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quart Rev Biophys*. 1977; 10: 1-34.
- 6- Zhong L, Putnam RJ, Johnson WC, Rao AG. Design and synthesis of amphipathic antimicrobial peptides. *Int J Peptide Pro Res*. 1995; 45: 337-47.
- 7- Conlon JM, Seidel B, Nielsen PF. An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. *Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & Pharmacology*. 2004; 137: 191-6.
- 8- Saeid G, Ahmad A, Thomas K. Brevinin-2R semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J Cell Molec Med*. 2007; 12: 1005-22.
- 9- WE D, Trueb L. *Biology of amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore; 1994.
- 10- Hasanvand Jamadi R, Asadi A, Hasanvand Jamadi M. In vitro evaluation of anticancer activity of brevinin-2R against AGS cell line. *J New Cell Molec Biotechnol*. 2014; 3: 107-10.
- 11- Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, et al. Brevinin-2R1 semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J Cell Molec Med*. 2008; 12: 1005-22.
- 12- Kacher J. Oral and maxillofacial pathology. Case of the month. Histoplasmosis. *Texas Dent J*. 2013; 130: 198-232.
- 13- Kudo Y, Takata T, Yasui W, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1998; 83: 2447-55.



- 14- Golub TR. Genome-wide views of cancer. *New Eng J Med*. 2001; 344: 601-2.
- 15- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*. 2006; 8: E239-E53.
- 16- Haigentz M, Silver CE, Corry J, et al. Current trends in initial management of oropharyngeal cancer: the declining use of open surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009; 266: 1845-55.
- 17- Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx: surgery, radiation therapy, or both. *Cancer*. 2002; 94: 2967-80.
- 18- Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17, 346 patients. *Radiother Oncol*. 2009; 92: 4-14.
- 19- Lin HY, Thomas JL, Chen HW, Shen CM, Yang WJ, Lee MH. In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions. *Int J Nanomed*. 2012; 7: 941-51.
- 20- Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian Cell Viability*: Springer; 2011. p. 7-12.
- 21- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988; 48: 589-601.
- 22- Gavanji S, Mohammadi E, Larki B, Bakhtari A. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. *Integrative Med Res*. 2014; 3: 142-52.
- 23- Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. protocols in in vitro *Hepatocyte Research*. 2015: 333-48.
- 24- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Peptide Science*. 1998; 47: 465-77.
- 25- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes Rendus Biologies*. 2004; 327: 539-49.
- 26- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*. 2000; 55: 4-30.
- 27- Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *New Eng J Med*. 2002; 347: 1199-205.
- 28- Zelezetsky I, Pag U, Sahl H-G, Tossi A. Tuning the biological properties of amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides*. 2005; 26: 2368-76.
- 29- Papo N, Shahar M, Eisenbach L, Shai Y. A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice. *J Biol Chem*. 2003; 278: 21018-23.
- 30- Papo N, Shai Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*. 2003; 24: 1693-703.

## Cytotoxicity Effect of Brevinin-2R Peptide on Oral Squamous Cell Carcinoma

Khazimeh F<sup>1</sup>, Golestan Nezhad Z<sup>1</sup>, Bakhtari A<sup>2</sup>, Bakhshi M<sup>3</sup>, Yousef Shahi H<sup>4</sup>, Gavanji SH<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dental Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

<sup>3</sup>Dept. of Dental Diseases, Faculty of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Student Research Committee, Faculty of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>5</sup>Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Isfahan (khorasgan) Branch, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Gavanji SH, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Isfahan (khorasgan) Branch, Isfahan, Iran

**E-mail:** shahin.Gavanji@yahoo.com

**Received:** 21 Jun 2015    **Accepted:** 10 Apr 2016

**Background and Objective:** Peptide as an agent in manufacturing new drugs has recently been taken into consideration. Brevinin-2R is a nano peptide with a wide range of biological actions. Thus, the current study was designed in order to evaluate the in vitro effects of Brevinin-2R on oral squamous cell carcinoma cells in comparison to normal mice fibroblast cells.

**Materials and Methods:** In this study, oral squamous cell carcinoma cells (KB) and normal mice fibroblast cells (L929) were cultured and treated with different concentrations of Brevinin-2R (0.1-30 µg/ml) for 24, 48 and 72 hours. Then, cell viability was calculated by MTT method. Data were fed to SPSS software (version 20) via which One Way ANOVA and Tukey tests was calculated for the collected data.

**Results:** The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of Brevinin-2R for KB cells and L929 cells were 15.48 and 24.14 µg/ml respectively, demonstrating that higher concentration of Brevinin-2R is necessary in order to reach IC<sub>50</sub> concentration for L929 cells (about 1.5 times).

**Conclusion:** Results point out that Brevinin-2R peptide is more effective on oral squamous cell carcinoma cells compared to normal mice fibroblast cells (L929).

**Keywords:** Brevinin-2R, Cell cytotoxic, Oral squamous cell carcinoma, Medical peptide