

علمی پژوهشی

بررسی اثر سمیت هیدرولیزات پروتئینی جوانه گندم بر سلول‌های سرطانی ریه (A549) به روش XTT

زهره کرمی^۱، سید هادی پیغمبر دوست^{۲*}، جواد حصاری^۲، بهروز اکبری ادرگانی^۳

۱- فارغ التحصیل دکتری تخصصی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۹)

چکیده

با توجه به این که درمان سرطان بیشتر از طریق شیمی درمانی و داروهای متعددی صورت می‌پذیرد که علاوه بر خاصیت درمانی با عوارض جانبی شدیدی برای بیمار همراه هستند، امروزه دانشمندان در حال بررسی درمان با استفاده از مواد فعال زیستی می‌باشند که از جمله آنها می‌توان پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال را بیان کرد. در این مطالعه برای اولین بار، اثر سیتوتوکسیکی پروتئین‌های هیدرولیز شده جوانه گندم به دست آمده از آنزیم-های پپسین، آلکالاز و پروتئیناز K بر رده سلولی A549 مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی A549 در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین (Penstrep) کشت داده شد. غلظت‌های مختلف هیدرولیزات در طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های سرطانی A549 اثر داده شد. در ادامه توانایی حیات سلول‌ها با استفاده از روش XTT بررسی شد. نتایج مطالعات حاکی از آن بود که پروتئین‌های هیدرولیز شده جوانه گندم وابسته به غلظت هیدرولیزات و زمان و نوع آنزیم دارای اثر سمیت است نتایج IC₅₀ هیدرولیزات پپسین، آلکالاز و پروتئیناز K برای سلول‌های A549 با مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۱۱/۱۷، ۱۲/۹۴ و ۱۱/۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم می‌تواند منبع مناسبی از پپتیدهای ضد سرطان باشد و به عنوان جایگزینی برای درمان‌های رایج سرطان مورد استفاده قرار بگیرند.

کلید واژگان: پروتئین جوانه گندم، هیدرولیز آنزیمی، فعالیت ضد سرطانی، سلول‌های آدنوکارسینوما اپیتلیال ریوی انسان (A549)

* مسئول مکاتبات: peighambardoust@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

جوانه گندم یکی از مهم ترین فراورده‌های جانبی حاصل از آسیاب گندم است که حاوی حدود ۱۰ درصد روغن بوده که به طور عمده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی، بهداشتی استفاده می‌شود فراورده جانبی مهم فرایند استخراج روغن، جوانه چربی گرفته شده (DWG^۴) نام دارد که تقریباً حاوی ۳۵ درصد پروتئین می‌باشد و بخش عمده پروتئینهای جوانه گندم شامل آل‌بومین و گلوبولین می‌باشد [۵]. به منظور ارزش افزایی برای این محصول که از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوان است و به علت غنی بودن این ماده از نظر پروتئین با ترکیب اسید آمینه مناسب، در این تحقیق تلاش خواهد شد تا از آن به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی استفاده شده و اثر سمیت هیدرولیزات پروتئینی جوانه گندم بر سلول‌های A549 مورد بررسی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی آرد جوانه گندم فاقد چربی

جوانه گندم از کارخانه آرد تابان (تهران) تهیه شد. نمونه‌های جوانه گندم پس از تمیز شدن به منظور غیر فعال سازی آنزیمهای آن تحت دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت ۸ ساعت توسط n-هگزان (۱:۸ w/w) چربی زدایی شد، این فرایند چندین مرحله با هگزان تمیز انجام شد تا زمانی که محتوای چربی به میزان کمتر از یک درصد برسد، سپس در دمای اتاق خشک شد. جوانه گندم فاقد چربی با استفاده از آسیاب چکشی آزمایشگاهی آسیاب شد. آرد جوانه گندم پس از غربال شدن با مش ۶۰، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند [۵].

۲-۲- آماده‌سازی ایزوله پروتئین از جوانه گندم

آرد جوانه گندم فاقد چربی در محلول ۱ mol/L NaCl (w/v) ۱:۸) در دمای محیط برای ۳۰ دقیقه همزده شد و سپس pH آن روی ۹/۵ با استفاده از ۱ mol/L NaOH تنظیم شد. بعد از ۳۰ دقیقه همزدن، سوسپانسیون در ۸۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی در pH ۴ با

سرطان ریه^۱ از شایع‌ترین نوع سرطان در دنیاست و به عنوان یک اپیدمی در نظر گرفته شده است به طوری که ۲۹ درصد از کل مرگ‌های ناشی از سرطان مربوط به سرطان ریه می‌باشد [۱]. سرطان ریه نوعی بیماری است که مشخصه آن رشد کنترل نشده سلول در بافت‌های ریه است. اگر این بیماری درمان نشود، رشد سلولی می‌تواند در یک فرآیند به نام متاستاز به بیرون از ریه گسترش پیدا کند و به بافت‌های اطراف یا سایر اعضای بدن برسد. امروزه تلاش‌های بسیاری برای ساخت پپتیدهای ضد میکروبی جدید با خواص درمانی، پزشکی و بیوتکنولوژی انجام شده است که از طریق اعمال تغییرات و یا طراحی توالی‌های اسید آمینه‌ای آنها امکان‌پذیر می‌باشد. با توجه به این‌که درمان سرطان بیشتر از طریق شیمی درمانی و داروهای متعدد صورت می‌پذیرد که علاوه بر خاصیت درمانی دارای اثرات سوء، از جمله حالت تهوع، آسیب رسانی به پلاکت‌های مغز و استخوان و کم خونی در فرد تحت درمان می‌باشد. امروزه درمان‌های ضد سرطانی با استفاده از مواد فعال زیستی در دست بررسی است که از جمله آنها پپتیدهای بیولوژیک با خواص درمانی زیاد و اثرات جانبی کم‌ترند که به دلیل نقش‌های مهم درون سلولی و مولکولی همانند: شناسایی مولکول، انتقال پیام، تکثیر سلولی و تمایز، جزء فاکتورهای اصلی برای پیشبرد فعالیت‌های ضد سرطانی و کاهنده رشد تومور هستند. مهار کننده پروتئاز بومن بیرک (BBI)^۲، پروتئین محلول در آب جدا شده از حبوبات و بسیاری از تک لپه ایها است که فعالیت ضد سرطانی آن در مطالعات درون شیشه‌ای و مدل‌های حیوانی مشخص شده است. اثرات ضد سرطانی پپتیدهایی با اندازه‌های مختلف از منابع گوناگون گزارش شده است [۲]. لونسین^۳ یک پپتید بازدارنده در سویا است که سبب مهار سلول‌های سرطانی می‌شود و دارای ۴۳ باقیمانده آمینواسیدی است [۳]. پپتیدهای زیست فعال با خاصیت ضد سرطانی همچنین در گیاهان غلافدار مانند لوبیا چیتی و لوبیا یونانی شناسایی شده اند [۴].

1. Lung
2. Bowman brik protease inhibitor
3. Lunasin

4. Defatted wheat germ

ابتدا یک محلول پروتئین (محلول ۱۰٪ ایزوله پروتئین) با استفاده از هم زدن مداوم تهیه شده و پس از تنظیم pH بر روی میزان ایتیم هر آنزیم، آنزیم‌های آلکالاز، پپسین و پروتئیناز K در غلظت‌های تعیین شده افزوده شده و هیدرولیز در زمان‌ها و دماهای مناسب برای هر کدام از آنزیم‌ها (جدول ۱) در انکوباتورهای شیکردار و در دما و pH ثابت انجام گرفت. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن در ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شده و مایع فوقانی (سوپرناتانت) پس از جمع آوری با خشک کن انجمادی خشک شد [۵].

استفاده از HCl (۱ mol/L) جهت رسوب پروتئین‌ها تنظیم شد و دوباره در ۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. رسوبات چندین بار با آب مقطر شسته شدند و در آب مقطر حاوی NaOH (۰/۱ mol/L) تا pH ۷ تنظیم شد. ذرات پراکنده با استفاده از خشک کن انجمادی خشک شد (Operon, Gyeonggi, South Korea) [۵].

۳-۲- هیدرولیز کنسانتره پروتئینی حاصل از جوانه گندم

Table 1 Proteolysis conditions used for Alcalase, Pepsin and Proteinase K enzymes

Enzyme	pH	Temperature (°C)	Enzyme/substrate Ratio	Treatment time (min)
Alcalase	8.0	52.3	1.46	233
Pepsin	3.0	37.4	1.58	270
Proteinase K	8.0	37.0	0.54	285

۶-۲- آماده‌سازی سلول سرطانی ریه (A549)

برای تیمار با پروتئین‌های هیدرولیز شده رده‌ی سلول سرطان ریه (A549) از NCBI (National Center for Biotechnology Information) تهیه شد. به منظور آزمایش از محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS^۱ (Gibco, Grand island, NY, USA) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (penstrep) برای رشد و تکثیر استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی محیط کشت سلولی در انکوباتور با اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. برای جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک‌ها، از محلول ۲۵ درصد تریپسین و بافر فسفات نمکی (PBS) استفاده شد [۸].

۷-۲- بررسی اثر سیتوتوکسیک پروتئین‌های

هیدرولیز شده

پس از آماده‌سازی سلول، محلول استوکی از نمونه‌های پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای سنتزی تهیه شد و داخل محیط کشت سلولها تا غلظت نهایی مورد نظر به صورت دو

۴-۲- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی نمونه

در نمونه‌ها پروتئین خام با روش کج‌لدال (N × ۵/۷)، چربی خام به روش سوکسله و خاکستر خام در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت با کوره الکتریکی اندازه‌گیری شد [۶].

۵-۲- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز WGPH بر اساس روش González-García و همکاران [۷] با استفاده از معرف OPA انجام شد. جهت ترسیم منحنی کالیبراسیون از استاندارد گلوکوتاتیون (GSH) (۱-۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) استفاده شد. ۳۶ میکرولیتر محلول‌های گلوکوتاتیون با ۲۷۰ میکرولیتر OPA مخلوط شد، سپس در دمای اتاق به مدت ۲ دقیقه گرمخانه گذاری شد و جذب آنها در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (PowerWave XS2 microplate reader, Biotek Instruments Inc., USA). در رابطه با نمونه‌های WGPH این پروتکل انجام شد و اعداد جذب به دست آمده در منحنی استاندارد وارد شد و میزان پپتید تعیین شد. محتوای پروتئین همچنین به روش بیورت با استفاده از استاندارد BSA با غلظت‌های ۱-۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تعیین شد. سرانجام میزان درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$DH = 100 \times \frac{\text{محتوای پروتئین}}{\text{محتوای پپتید}}$$

5. Roswell Park Memorial Institute Medium
6. fetal bovine serum

AH و AC جذب‌های خوانده شده برای زنده ماندن سلول‌ها در محیط کشت حاوی هیدرولیزات‌ها و بدون هیدرولیزات

برابر رقیق شدند. سلول‌های داخل تریپسینه شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌ها در غلظت 10^6 cells/ $100 \mu\text{L}$ در محیط کشت تازه تهیه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سلول (۲۰۰۰۰ (۲۴ h)، ۱۰۰۰۰ (۴۸ h)، ۵۰۰۰ (۷۲ h) cells/well) به هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در انتهای دوره، ۵۰ میکرولیتر XTT (1 mg/mL) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت گرمخانه گذاری شدند. جذب نمونه‌ها در ۴۶۵ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر (PowerWave X S2, Biotek Instruments Inc., USA) خوانده شد. ارزیابی مهار سلول‌های زنده توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط معادله زیر تعیین شد [۸].

$$\text{Viability inhibition (\%)} = 100 - (\text{AH} \times 100 / \text{AC})$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های آرد جوانه گندم، ایزوله پروتئینی و پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم

ویژگی‌های آرد جوانه گندم، ایزوله پروتئینی و پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که از جدول ۲ قابل مشاهده است میزان پروتئین نمونه هیدرولیز شده در مقایسه با آرد جوانه گندم و ایزوله پروتئینی بیشتر می‌باشد. میزان خاکستر در نمونه هیدرولیز شده و ایزوله پروتئین کمتر از آرد جوانه گندم می‌باشد.

Table 2 Chemical specification of wheat germ flour, protein isolate, and wheat germ hydrolyzed protein (WGHP)

	Protein (%)	Ash (%)	Fat (%)	Moisture (%)
Wheat erm flour	28.13±0.13	3.49±0.20	10.30±0.01	10.26±0.09
Protein isolate	54.81±2.20	3.11±0.50	0.75±0.03	4.26±0.08
Wheat germ hydrolyzed protein (WGHP)	59.31±2.30	2.10±1.30	0.22±0.01	1.50±0.50

پروتئین کدو توسط آلکالاز، فلیورزایم، پروتامکس و نوتراز گزارش شد.

۳-۲- درجه هیدرولیز نمونه‌های هیدرولیز شده و

بررسی اثر سمیت پروتئین‌های هیدرولیز شده بر

رده سلولی A549

رده سلولی A549 سلول‌های اپیتلیال مشتق شده از بافت سرطانی ریه هستند. این سلول‌های اپیتلیال با سنتز و ترشح سوفاکانت، نقش مهمی در عملکرد و ایمنی شش‌ها دارند. اپیتلیوم ریه همچنین نقش به‌سزایی را در کنترل و پیشرفت واکنش‌های التهابی در ریه ایفاء می‌کند. سلول‌های اپیتلیال ریه قادر به ترشح سیتوکاین‌های التهابی هستند و می‌توانند برای تحقیقات التهاب سلولی مورد استفاده قرار گیرند. زمانی که سلول‌های ترشح‌کننده موکوز در ریه، سرطانی شده باشند، این سلول‌ها، آدنو کارسینوما ریه نامیده می‌شوند. این نوع سرطان

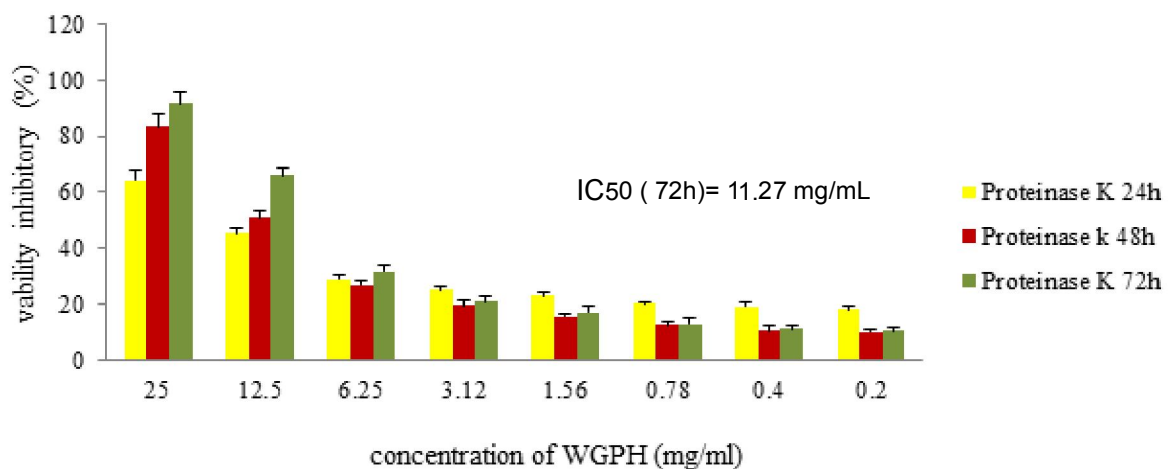
میزان چربی و رطوبت هم در نمونه هیدرولیز شده نسبت به نمونه آرد جوانه گندم و ایزوله پروتئینی در مقادیر کمتری می‌باشد. نمونه هیدرولیز شده دارای پروتئین بیشتری در مقایسه با ایزوله و آرد جوانه گندم می‌باشد. علت این موضوع تجزیه شدن پروتئین در اثر هیدرولیز و به دنبال آن سانتریفوژ بود که منجر به جداسازی قسمت‌های غیرپروتئینی از نمونه هیدرولیز شده گردید [۹]. در حالی‌که چربی موجود در پروتئین هیدرولیز شده و ایزوله کمتر از چربی موجود در آرد جوانه گندم بود. علت کاهش چربی، فرآیند چربی‌گیری انجام شده بر آرد جوانه گندم قبل از تهیه ایزوله بود. در مورد میزان خاکستر نسبتاً بالا در نمونه هیدرولیز شده را می‌توان به املاح موجود در بافر مورد استفاده در فرایند هیدرولیز یا نمک تشکیل شده در جریان تنظیم pH در مراحل اولیه کار مرتبط دانست [۹]. نتایج مشابه با این تحقیق توسط Shoemaker و Muhamyankaka [۱۰] از هیدرولیز

اثر هیدرولیزات پروتئین *Oyster* را بر علیه رده سلولی HT-29 (سرطان روده) گزارش کردند. همان طور که دیده شد هیدرولیزات پپسین اثر سمیت بیشتری بر رده سلولی A549 نشان دادند که تغییر در فعالیت بیولوژیکی در بین هیدرولیزات آنزیمی مختلف به احتمال زیاد به تفاوت در توزیع پپتیدها و ترکیب آمینواسیدها نسبت می‌دهند که خود ناشی از خصوصیات منحصر به فرد هر آنزیم، مکانیسم عمل و شرایط هیدرولیز می‌باشد [۱۳]. همان طور که از شکل ۱ دیده می‌شود هیدرولیزات پپسین IC_{50} پایین‌تری ($11/17 \text{ mg/mL}$) را نسبت به پروتئیناز K ($11/27 \text{ mg/mL}$) و آلکالاز ($12/49 \text{ mg/mL}$) نشان دادند. نتایج مورفولوژیکی (شکل ۲) نشان می‌دهد، هیدرولیزات پپسین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به طور معناداری (بالای ۷۰ درصد) سلول‌های زنده را کاهش داده‌اند و می‌توان تراکم زیاد سلول‌های A549 را در نمونه تیمار نشده (a) مشاهده کرد که بعد از تیمار کردن با هیدرولیزات پپسین (b) تراکم سلول‌های زنده به شدت کاهش پیدا کرده است. Jang و همکاران [۱۴] یک رابطه بین مرگ سلول‌های سرطانی و پپتیدهای غنی از آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید یافتند. González-Montoya و همکاران [۱۵] گزارش کردند که پپتیدهای حاوی گلوتامین و سرین سبب مرگ سلول‌های سرطانی روده می‌شوند. بنابراین می‌توان گفت هیدرولیزات پروتئینی جوانه گندم می‌تواند حاوی پپتیدهای با فعالیت ضد سرطانی بر علیه رده سلولی A549 باشند.

بیش از ۴۰ درصد سرطان‌های ریه را به خود اختصاص داده [۱۱].

درجه هیدرولیز هیدرولیزات به دست آمده از آنزیم‌های پپسین، آلکالاز و پروتئیناز K با توجه به این که هر سه آنزیم اندوپپتیداز می‌باشند، با استفاده از روش OPA به ترتیب مقادیر $2/1 \pm 0/88$ ، $2 \pm 0/48/8$ و $4/1 \pm 0/51/02$ به دست آمد. درجه هیدرولیز هیدرولیزات پپسین مقدار بیشتری را نسبت به هیدرولیزات به دست آمده از آلکالاز و پروتئیناز K نشان می‌دهد

اثر سمیت پروتئین‌های هیدرولیز شده پپسین، آلکالاز و پروتئیناز K بر رده سلولی A549 در غلظت‌های ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تا ۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که نوع و غلظت نمونه‌های هیدرولیز شده تاثیر معنی‌داری بر سمیت هیدرولیزات‌ها بر رده سلولی A549 دارد (شکل ۱). همچنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی هیدرولیزات در مهار سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر سمیت هیدرولیزات بر رده سلولی A549 بیشتر می‌شود. همچنین با گذشت زمان اثر سمیت افزایش پیدا کرده است و در زمان ۷۲ ساعت اثر سمیت به بالای ۷۰ درصد رسیده است. این نتایج نشان داد که رفتار نمونه‌ها وابسته به غلظت و زمان می‌باشد و با افزایش غلظت و زمان اثر سمیت نمونه‌ها با توجه به فرصت اثرگذاری بیشتر پپتیدهای ضد سرطان در هیدرولیزات‌ها بیشتر می‌شود که در تطابق با نتایج Umayaparvathi و Meenakshi [۱۲] می‌باشد که رفتار وابسته به غلظت و زمان



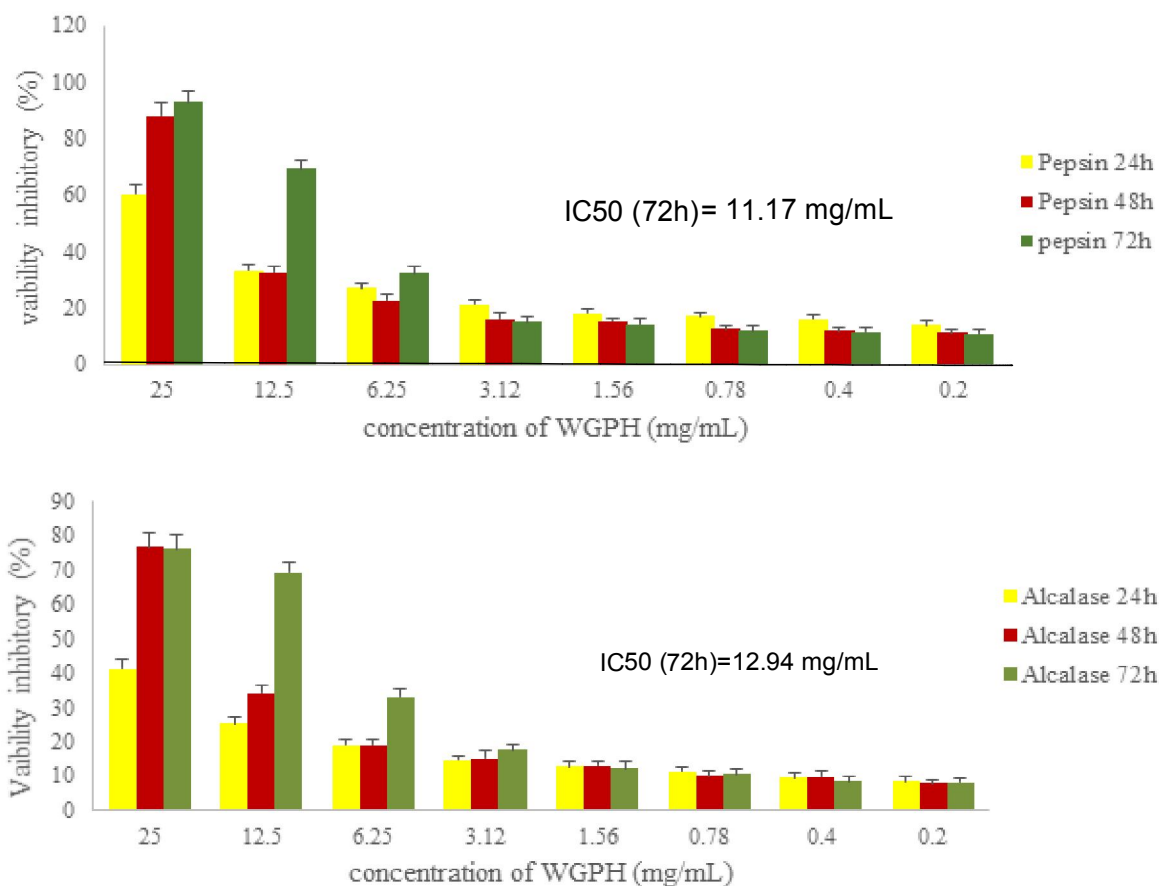


Fig 1 Effect of wheat germ hydrolyzed proteins (WGHP) using Proteinase K (top), Pepsin (middle) and Alcalase (bottom) on inhibition of human lung carcinoma A549 cells in time intervals of 24, 48 and 72 h

پپتید می‌باشند. هم چنین اثر سمیت پپتید GL-9 بر روی رده سلولی آدنوکارسینوما اپیتلیال ریوی انسانی (A549) توسط Hooshmand و Assodeh [۱۷] بررسی شد. پپتید GL-9 یک پپتید ۹ اسید آمینه‌ای با توالی GASRMWYFL است که در غلظت‌های متفاوت ۱۲، ۲۵ و ۵۰ $\mu\text{g/mL}$ سمیت آن بر سلول‌های A549 بررسی شد. سمیت پپتید GL-9 بر روی رده سلولی A549 بر پایه سنجش MTT در طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مشخص شد. نتایج مطالعات حاکی از آن بود که پپتید GL-9 وابسته به غلظت بر روی رشد رده سلولی A549 در زمان ۴۸ ساعت دارای اثر سمیت است.

توسعه ترکیبات ضد سرطانی از منابع طبیعی در علوم غذایی و دارویی مهم است. در این تحقیق نتیجه گرفته شد که هیدرولیز پروتئین جوانه گندم می‌تواند منجر به تولید پپتیدهای شود که اثر

فعالیت سیتوتوکسیک ۱۸ پروتئین هیدرولیز شده ماهی توسط Picot و همکاران [۱۶] مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت فعالیت ضد سرطانی هیدرولیزات به دست آمده از پروتامکس و آلکالاز مورد تایید قرار گرفت. این محققان فعالیت سیتوتوکسیک بر رده سلولی A549 را به حضور پپتیدهایی ضد سرطان در هیدرولیزات‌ها نسبت دادند. جداسازی پپتیدهای ضد سرطان از دیگر منابع گیاهی از جمله گندم سیاه^۷ و جینسنگ نیز گزارش شده است. یک پپتید جدا شده از دانه گندم سیاه با وزن مولکولی ۴ کیلو دالتون دارای فعالیت ضد تکثیری در برابر سرطان کبد، خون و سرطان پستان بوده است [۴]. بخش آب گریز جدا شده از جینسنگ فعالیت ضد توموری زیادی در برابر سلول‌های لنفوم موش نشان داده است. این پپتیدها به صورت دی و یا تری

7. buckwheat

نوید دهنده ترکیبات ضد سرطان برای مکمل‌های غذایی باشد هر چند مطالعات بیشتری در سیستم *in vivo* ضروری است.

سمیت بر رده سلولی A549 دارند و ممکن است اثر قابل توجهی در درمان سرطان ریه داشته باشد. با این نتایج، پیشنهاد می‌شود که پروتئین‌های هیدرولیز شده جوانه گندم ممکن است

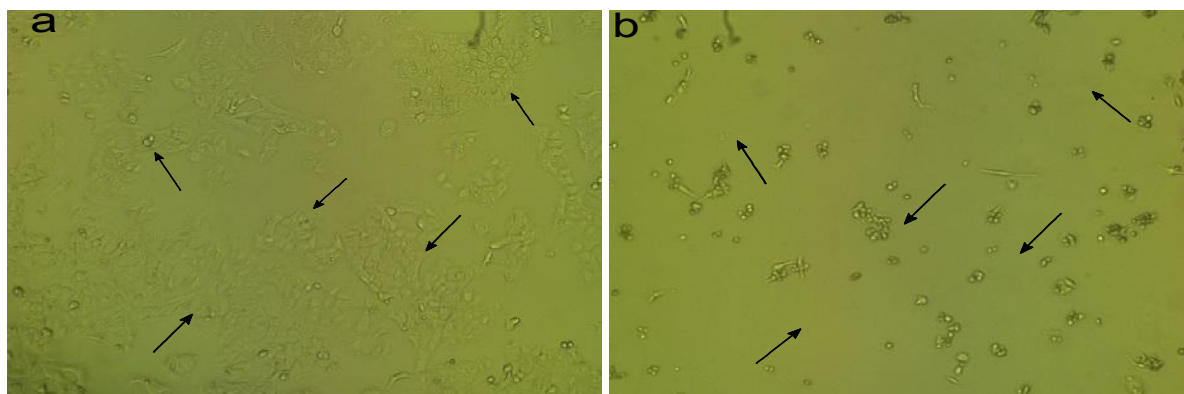


Fig 2 Optical microscope images of human lung carcinoma A549 cells: (a) non-treated, and (b) treated with WGPH from Pepsin (25 mg/mL, 72 h). Pepsin-treated cells showed areas with minor cellular density (arrows), compared to non-treated control cells presenting a continuous growth over the plate; Image magnification: 40×

[4] Leung EH, Ng TB. (2007). A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. *Journal of Peptide Science: an official publication of the European Peptide Society* 13(11):762-767.

[5] Zhu K, Zhou H, Qian H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry* 41(6):296-302.

[6] AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03. Association of official analytical chemists Arlington, VA, USA.

[7] González-García E, Marina ML, García MC. (2014). Plum (*Prunus Domestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: Extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods* 11:428-437.

[8] Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Araudin I, Gómez-Guillén MC, Montero P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International* 44(4):1044-1051.

۴- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدر دانی خود را از ریاست محترم آزمایشگاه‌های کنترل و غذا و دارو، سازمان غذا و دارو تهران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی که در جهت فراهم آوردن امکانات این مطالعه همکاری لازم را مبذول داشتند، اعلام می‌دارند.

۵- منابع

- [1] Silvestri GA, Alberg AJ, Ravenel J. (2009). The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*; 339:b3053.
- [2] Hartmann R, Meisel H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):163-169.
- [3] Fernández-Tomé, S., Sanchón, J., Recio, I., Hernández-Ledesma, B., (2018). Transepithelial transport of lunasin and derived peptides: Inhibitory effects on the gastrointestinal cancer cells viability. *Journal of Food Composition and Analysis* 68, 101-110.

- wey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1):9-15.
- [14] Jang A, Jo C, Kang K-S, Lee M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry* 107(1):327-336.
- [15] Gonzalez-Montoya M, Hernandez-Ledesma B, Silvan JM, Mora-Escobedo R, Martinez-Villaluenga C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry* 242:75-82.
- [16] Picot L, Bordenave S, Didelot S, Fruitier-Arnaudin I, Sannier F, Thorkelsson G, et al. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry* 41(5):1217-1222.
- [17] Hooshmand K, Assodeh A. (2016). The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells. *Journal of cellular and molecular researches (Iranian Journal of Biology)* 29:463-473.
- [9] Khantaphant S, Benjakul S, Kishimura H. (2011). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry* 46(1):318-327.
- [10] Muhamyankaka V, Shoemaker C, Nalwoga M, Zhang XM. (2013). Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. *International Food Research Journal*, 2227-2240.
- [11] Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. *Lung Cancer*, 45 Suppl 2:S3-S9.
- [12] Umayaparvathi S, Meenakshi S, Vimalraj V, Arumugam M, Sivagami G, Balasubramanian T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4(3):343-53.
- [13] Contreras MdM, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Martín-Álvarez PJ, Recio I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a

Cytotoxic effect proteins hydrolysates from wheat germ on human lung carcinoma A549 cell lines in XTT assay

Karami, Z. ¹, Peighambardoust, S. H. ^{2*}, Hesari, J. ², Akbari-Adergani, B. ³

1. PhD student, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Professor of Food Technology, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

(Received: 2018/07/14 Accepted:2019/06/09)

Since cancer treatment has been done through chemotherapy and various drugs that are accompanied with severe side effects in addition to therapeutic properties, nowadays scientists are investigating anticancer therapies using natural compounds such as hydrolyzed proteins and bioactive peptides. In this study, for the first time, hydrolyzed proteins obtained from Pepsin, Proteinase K and Alcalase enzymes were used to examine their cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma cells (A549). Human lung carcinoma A549 cell lines were grown in 90% RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% Penstrep. Different concentrations of hydrolysates during times of 24, 48 and 72 h were affected by A549 cell lines via XTT assay. Then, the cell survival ability was evaluated by XTT method. Results showed that hydrolysates produced from wheat germ protein affected the viability of cells and it depending on the enzyme applied, concentration and time. The results of IC₅₀ were evaluated for A549 cells in the case of Pepsin, Alcalase and Proteinase K hydrolysates at 72 h, 11.17 mg/mL, 12.94 mg/mL and 11.27 mg/mL. These results showed that wheat germ protein hydrolysates would be used as new source of anticancer peptides and could be a replace for common cancer therapy drugs in the near future.

Keywords: Wheat germ protein, Enzymatic hydrolysis, Anticancer activity, Human lung adenocarcinoma cells (A549).

* Corresponding Author E-Mail Address: peighambardoust@tabrizu.ac.ir