مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱۲، اسفند۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۹)

# اثر عصاره سلولی باکتری بومی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی مرگ سلول‌های سرطانی کولون (HT29) و بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2*

**الهه علی‌عسگری [۱]، امیر میرزایی [۲*]، حسن نوربازرگان [۳]، علی‌اصغر باقری کشتلی [۲]**

[۱]گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، [۲] گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران، [۳] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یکی از عوامل پیشگیری کننده از ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان شناخته شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره باکتری بومی‌پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 بر روی رده سلولی سرطان کولون(HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ابتدا عصاره سلولی کشته شده با حرارت، باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. در ادامه اثرات سمیت سلولی عصاره سلول باکتری روی رده سلولی سرطانی HT29 و نرمال HEC293 در مدت زمان ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT بررسی شد. هم‌چنین، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در رده سلولی HT29 با استفاده روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. میزان القای آپوپتوز به وسیله روش فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT نشان داد که عصاره باکتری *پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت‌های فوق الذکر و در مدت زمان ۲۴ ساعت باعث کاهش بقای سلول HT29 به ترتیب به میزان ۰/۹۵±۰/۴۴، ۸۲/۵±۰/۶۴، ۷۳/۵۴±۰/۲۱، ۵۱/۴۹±۰/۸۷، ۳۹/۵±۰/۴۵ و ۱۹/۷±۰/۵۵ درصد شد. هم‌چنین در همین غلظت ها در رده سلولی HEC293 به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان ۹۸/۶۷±۰/۵۶، ۹۴/۳۱±۰/۸۷، ۹۲/۱±۰/۲۶، ۸۹/۹۱±۰/۴۲، ۸۴/۳۴±۰/۵۵، ۷۹/۲۹±۰/۴۹ شد. نتایج Real Time PCR افزایش و کاهش بیان ژن‌های *Bax* (p<۰/۰۱)و *Bcl2* (p<۰/۰۱) را به ترتیب به میزان۲/۷۶±۰/۵۴، ۰/۲۱ ±۰/۴۳ طی ۲۴ ساعت در مقایسه با ژن مرجع GAPDH نشان داد. هم‌چنین نتایج فلوسیتومتری میزان آپوپتوز ۳۵/۶۲ ٪ را در غلظت سمیت سلولی ۵۰ درصد(IC50) عصاره باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** عصاره باکتری بومی‌پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 می‌تواند سبب القای آپوپتوز در رده سلولی HT29 شود و میزان سمیت کمتری بر روی سلول نرمال HEC293 دارد، بنابراین می‌توان با انجام مطالعه‌های بیشتر از این باکتری به عنوان یک محصول پروبیوتیک ضدسرطان، در درمان و پیشگیری از سرطان کولون استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** *لاکتوباسیلوس کازئی*، پروبیوتیک، رده سلولی HT29، سمیت سلولی، آپوپتوز

[*]**نویسنده مسئول:** امیر میرزایی، رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، گروه زیست شناسی
**Email:** Amir_mirzaie92@yahoo.com

**مقدمه**

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان و با اثر بر فلور میکروبی بدن، باعث ایجاد اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان می‌شوند(۲ و۱). بیشتر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده بزرگ انسان می‌باشند و بعضی از این میکروارگانیسم‌ها سویه‌هایی از باکتری‌های لاکتوباسیلوس هستند که به ندرت برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و کاربرد آنها از دیرباز در تهیه محصولات غذایی بدون ایجاد اثرات سوء به اثبات رسیده است(۴ و۳). طبق مطالعه‌های انجام شده از میان باکتری‌های پروبیوتیک گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس دارای اثربخشی بیشتری نسبت به انواع پروبیوتیک‌ها از جمله بیفیدوباکتری ها و مخمرها می‌باشند(۶ و۵). لاکتوباسیل‌ها، باکتری‌های پلی‌مرفیک، بی هوازی اختیاری و غیرمتحرک هستند که از طریق تخمیر قندها تولید انرژی می‌کنند که حداقل نیمی‌از فراورده‌های آن اسید لاکتیک است(۸و۷).

به طور کلی، پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی شامل؛ اسیدچرب با زنجیره کوتاه مثل استات، لاکتات، سوکسینات، بوتیرات، $H_2O_2$ و ترکیب‌های باکتریوسین تولید می‌کنند که هم برروی باکتری‌های گرم مثبت‌ها و هم روی گرم منفی‌ها اثر می‌گذارند(۱۰و۹). پروبیوتیک‌ها با اتصال به جایگاه‌های اتصال موجود در سلول‌های پوششی، رقابت با باکتری‌های پاتوژن برای دریافت مواد مغذی، کاهش pH، تولید باکتریوسین و $H_2O_2$ از حضور باکتری‌های مضر و بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند (۱۲ و۱۱). مطالعه‌ها نشان داده است که پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب موتاسیون‌ها، ترکیب‌های القا کننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند(۱۴و۱۳). به طور کلی، سرطان که یک بیماری نامتجانس ژنتیکی است که پس از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین علت شایع مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. یکی از شایع‌ترین نوع سرطان دستگاه گوارش در ایران، سرطان روده بزرگ است که از نظر بروز در مردان ایرانی، رتبه سوم و در زنان، رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است(۱۵). در آزمایش‌های برون‌تنی نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها در سرکوب زخم‌های نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ در مدل‌های موش نقش دارند(۱۶). اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیر فعال کردن ترکیب‌های میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد(۱۷). هم‌چنین یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضدتکثیری سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز

است(۱۸). آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که نقش کلیدی در تنظیم تعداد سلول‌ها دارد(۱۹). در بسیاری از سرطان‌ها، کاهش توانایی در پیش بردن آپوپتوز باعث تغییر در فرآیند تکثیر سلولی و به هم خوردن آن می‌شود. تنظیم در زنده مانی و مرگ سلول‌ها به وسیله مولکول‌های عمل کننده در فرایند آپوپتوز می‌تواند نقش بسزایی در پیشگیری و درمان سرطان‌ها داشته باشد(۲۰). شواهد بسیاری وجود دارند که پروبیوتیک ها می‌توانند نقشی در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز داشته باشند(۲۱). یکی از ژن‌های مهم درگیر در فرآیند آپوپتوز، ژن‌های *Bax* و *Bcl2* می‌باشد که از جمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به شمار می‌روند. از آن جا که در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم خورده و سلول‌ها برای رشد و تکثیر بی رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و فرایند سرطانی شدن وجود دارد. بنابراین بررسی تغییرات بیانی این ژن‌ها می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی و یا تشخیصی در مطالعه‌های سرطان به شمار رود.

بر اساس این اطلاعات، پیشرفت زیادی در زمینه اثرات پروبیوتیک‌ها بر آپوپتوز و مسیرهای تکثیر سلولی ایجاد شده است که ممکن است زمینه‌ای برای استفاده از پروبیوتیک‌ها در جهت مقابله با سرطان و القای آپوپتوز در آن‌ها، در آینده‌ای نزدیک باشد. با توجه به تأثیر میکروفلور روده در کاهش توسعه سرطان روده، تولید انواع جدیدی از فراورده‌های پروبیوتیک باکتریایی که ضمن جلوگیری از ایجاد سرطان، باعث مهار سلول‌های سرطانی شده و هیچ اثر مخربی بر روی سلول‌های سالم نداشته باشد، امری مهم به نظر می‌رسد. مطالعه‌ها نشان داده است که باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به یک جنس در نقاط مختلف جغرافیایی ممکن است دارای ترکیب‌های سلولی مختلف و دارای اثرات مختلف پروبیوتیکی باشند و بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره باکتری پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 بر روی رده سلولی سرطان کولون و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* بود.

**روش بررسی**

در این مطالعه تجربی، ابتدا سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی* استاندارد PTCC 1508 از کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر زیستی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شده و در محیط کشت MRS broth کشت داده شدند. به دنبال آن، باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت MRS agar کشت داده شده و از خالص بودن کلنی‌ها اطمینان حاصل شد.

جهت تهیه باکتری کشته شده به وسیله حرارت، ابتدا باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در محیط کشت MRS broth به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به دنبال آن از سوسپانسیون با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه رسوب تهیه شد و مایع رویی جدا شد. رسوب تهیه شده چندین بار با PBS شستشو داده شد

و غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. لازم به ذکر است جهت اطمینان از غیر فعال شدن باکتری‌ها، مجدداً کشت داده شدند.

رده سلولی سرطان کولون (HT29 cell line) و سلول نرمال HEC293 از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 (Biosera, USA) غنی شده با ۱ (V/V) پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد رطوبت قرار داده شدند.

به منظور بررسی اثرات کشندگی عصاره سلول باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* روی رده سلولی HT29 و HEC293 از روش رنگ سنجی MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره سلول باکتری کشته شده با حرارت در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT29 و HEC293 تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵ $CO_2$ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰×(جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

هم‌چنین میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد.

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن،آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه فتونانومتر(IMPLEN GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل باکیت Revert AidTM First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵X، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگوdT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات(۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر(تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی ـ زمانی به صورت ۲۵

درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت بردار معکوس) و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف *Bax*، *Bcl2* بوده وژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف Bax به صورت 5'- TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG -3' جلویی، دمای ۶۸ درجه سانتی گراد و 5'- AGCTTCTTGGTGGACGCATC -3' برگشتی، دمای ۶۵/۳ درجه سانتی‌گراد بود. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف Bcl2 به صورت 5'- TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC -3' جلویی، دمای ۶۷ درجه سانتی گراد و 5'- CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG -3' برگشتی، دمای ۶۶/۳ درجه سانتی گراد و برای ژن مرجع GAPDH به صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' جلویی، دمای ۶۶/۹ درجه سانتی گراد و 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشتی، دمای ۶۳/۴ درجه سانتی‌گراد است. برای درستی توالی آغازگرها و اطمینان از عدم اتصال آنها به توالی‌های غیر اختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) شدند. در نهایت واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه Light cycler (Bioneer، کره) با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه انجام گرفت.

به منظور بررسی میزان القای آپوپتوز در سلول‌های کولون(HT29) تیمار شده با عصاره سلول باکتریایی، این سلول‌ها با استفاده از روش AnnexinV/propidium iodide (PI) (Apoptosis detection kit, Roch, Germany) و دستگاه فلوسیتومتری بر اساس دستورالعمل مربوطه مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های سرطانی کولون ($1\times10^5$ سلول/چاهک) با غلظت IC50 عصاره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده کولون به عنوان کنترل منفی و از خود رنگ Annexin و PI به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان سلول‌های نکروز بر آپوپتوز شده به وسیله دستگاه فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفتند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند .

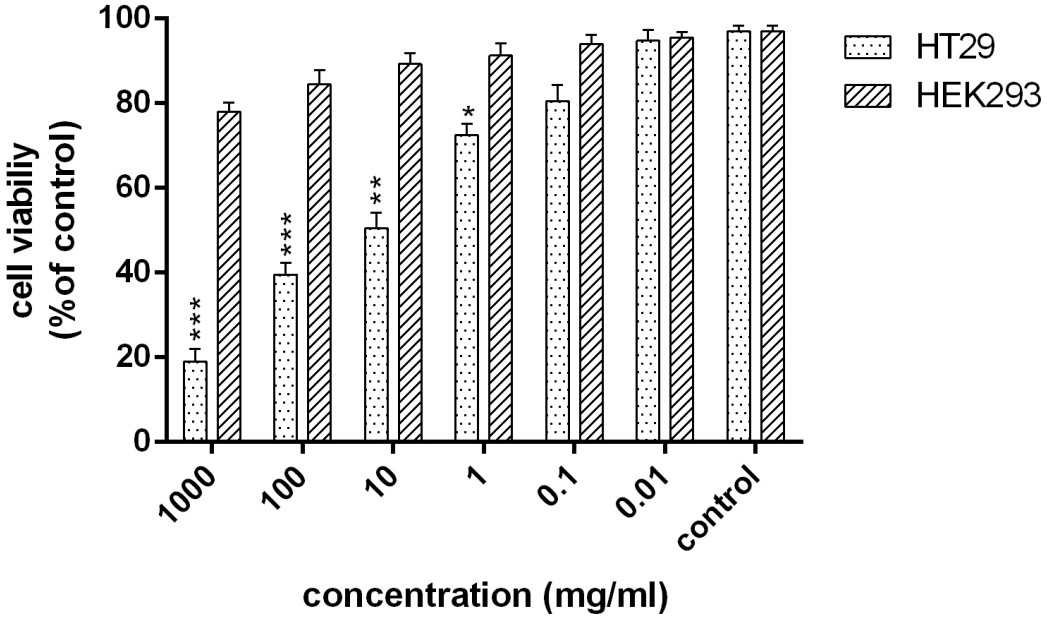
**یافته ها**

تیمار سلول های HT29 با غلظت‌های مختلف ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت کاهش بقای زیستی سلول‌ها را به ترتیب به میزان ۰/۴۴±۰/۹۵، ۰/۶۴± ۸۲/۵، ۰/۲۱±۷۳/۵۴،

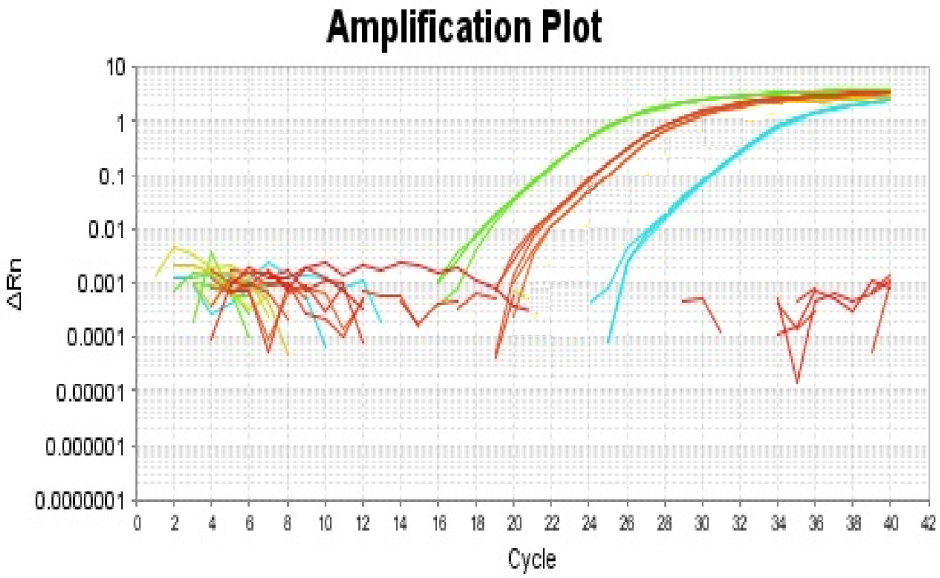
۰/۸۷±۵۱/۴۹، ۰/۴۵ ±۳۹/۵ و ۰/۵۵±۱۹/۷ شد. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که عصاره سلولی *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت‌های ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته‌اند که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است($p<0/001$)، در حالی که غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداده‌اند و از نظر آماری معنی‌دار نبوده است. هم چنین میزان IC50 عصاره سلول باکتری بر روی رده HT29 معادل ۴۹/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال HEC293 نشان داد که در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان ۰/۵۶±۹۸/۶۷، ۰/۸۷±۹۴/۳۱، ۰/۲۶±۹۲/۱، ۰/۴۲±۵۵/۹۱، ۰/۸۹±۸۴/۳۴، ۰/۴۹±۷۹/۲۹ شد(نمودار۱).

آنالیز تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در سلول HT29 تیمار شده با غلظت سمیت سلولی۵۰ درصد(IC50) عصاره سلولی بعد از ۲۴ ساعت با روش Real Time PCR انجام شد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد(نمودار ۳ و ۲). در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره سلولی) و نمونه‌های کنترل(سلول‌های تیمار نشده با عصاره سلولی) محاسبه و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ (نسبت ژن هدف به ژن مرجع (GAPDH) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه شد. نسبت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* به ژن مرجع GAPDH در رده سلولی سرطانی HT29 تیمار شده با عصاره سلول باکتری به ترتیب به میزان ($p<0/01$) ۰/۵۴±۲/۷۶، ($p<0/01$) ۰/۴۳± ۰/۲۱ طی ۲۴ ساعت افزایش و کاهش یافت (نمودار ۴).

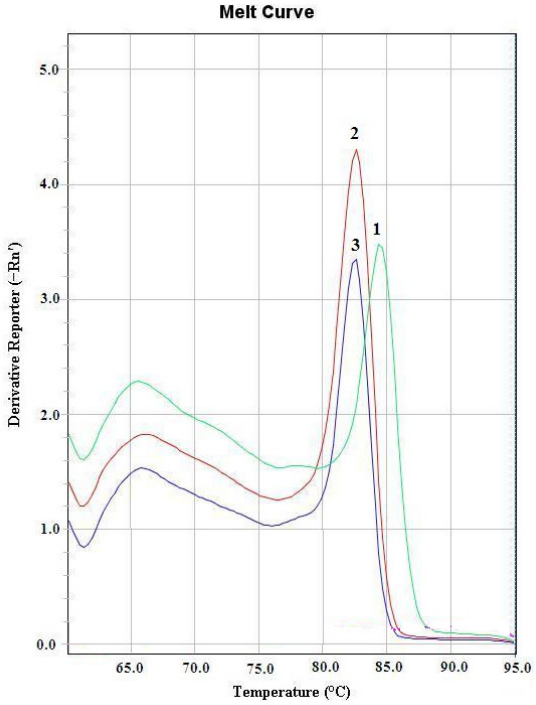
به منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های کولون تیمار شده با عصاره سلول باکتری کشته *لاکتوباسیلوس کازئی*، این سلول‌ها با FITC Annexin V and PI رنگ‌آمیزی شده و به وسیله دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا سلولی منتقل شده و به وسیله Annexin V رنگ می‌شود و رنگ PI به هسته سلول در زمان نکروز متصل می‌شود. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده است که طی آن مربع سمت چپ بالا (Q1) بیانگر درصد سلول‌های آپوپتوز تأخیری، مربع بالا سمت راست(Q2) نشان دهنده سلول‌های دچار آپوپتوز اولیه می‌باشد. همان‌طوری که نتایج نشان می‌دهد عصاره سلول باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* سلول را ۱۵/۹۸ درصد به سمت آپوپتوز اولیه و ۱۹/۶۴ به سمت آپوپتوز تأخیری هدایت نموده است(نمودار ۵).



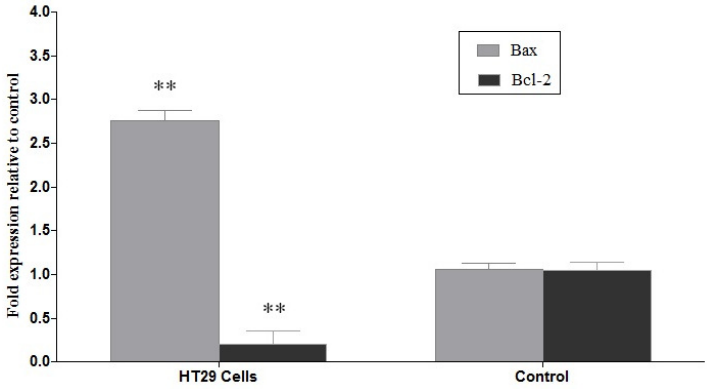

**نمودار ۱: درصد بقای سلول های HT29 و HEC293 در برابر غلظت های مختلف عصاره سلول باکتری کشته شده در مدت زمان ۲۴ ساعت ; نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است (*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱ ، *** P <۰/۰۰۱ : n=3).**



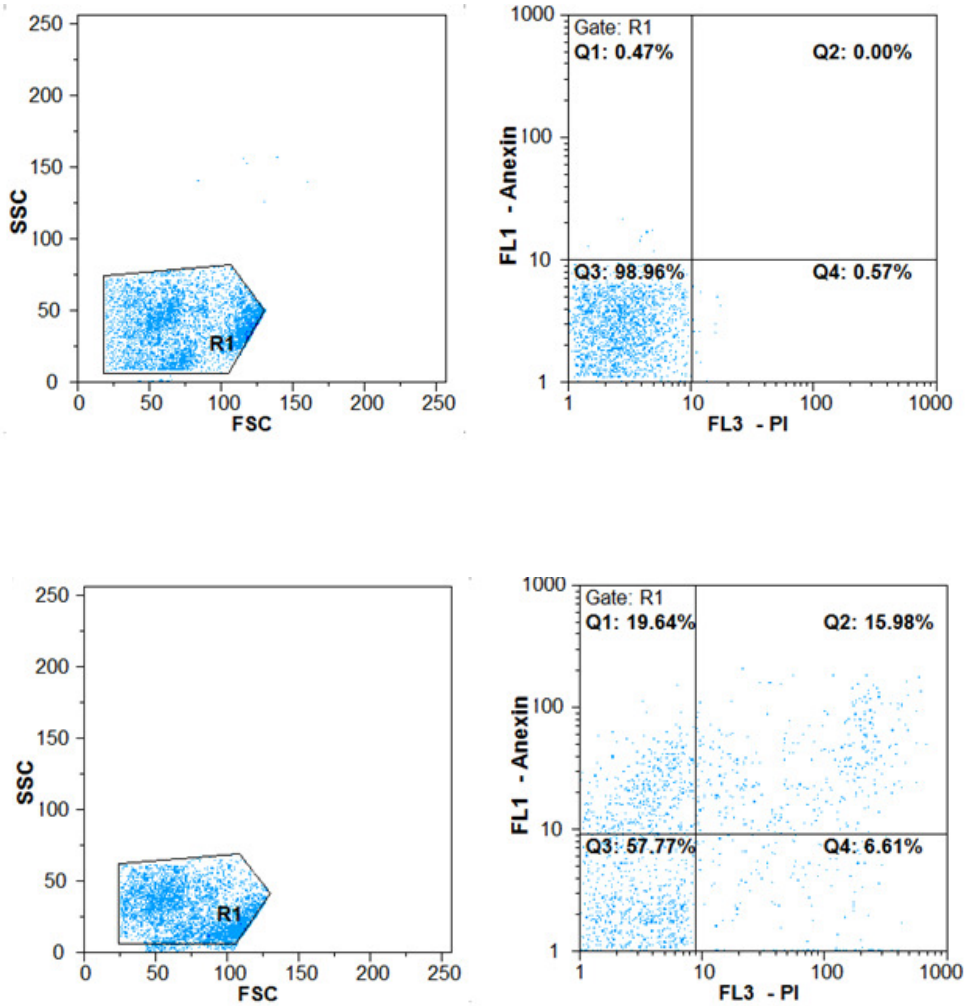

**نمودار۲: نمودار حاصل از تکثیر ژن‌های *Bax* (سبز رنگ)، *Bcl2* (آبی رنگ) و *GAPDH* (قرمز رنگ). همانطور که مشاهده می‌وشد از سیکل ۱۸ به بعد نمودار تکثیر حالت لگاریتمی‌پیدا می‌کند که نشان دهنده تکثیر ژن‌های هدف است.**




**نمودار ۳. منحنی ذوب ژن‌های *Bax*، *Bcl2* و *GAPDH* که محور عمودی نشان دهنده ی مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده درجه سانتی گراد; الگوی منحنی ذوب ژن *GAPDH* ۸۲/۸۱ درجه سانتی گراد (۲) و منحنی ذوب ژن *bax* در دمای ۸۴/۹۱ سانتی گراد نشان داده شده است (۱). منحنی ذوب ژن *bcl2* در دمای ۸۲/۳۴ سانتی گراد نشان داده شده است (۳).**



**نمودار ۴. نمودار میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به کنترل (ژن GAPDH). نسبت بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax*، به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی کولون تیمار شده به میزان (p<۰/۰۱) ۲/۷۶±۰/۵۴، (p <۰/۰۱) ۰/۲۱ ±۰/۴۳ طی ۲۴ ساعت تغییر یافت.**




**نمودار ۵. نتایج آنالیز فلوسایتومتری تاثیر عصاره سلول باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بروی رده سلولی سرطان کولون.** دو تصویر بالا) نمونه کنترل تیمار نشده، دو تصویر پایین) نمونه تحت تیمار عصاره سلولی.در تصاویر چهارخانه: مربع سمت چپ پایین: سلول های زنده، مربع سمت چپ بالا: آپوپتوز اولیه، مربع سمت راست پایین: نکروز، مربع سمت راست بالا: آپوپتوز تاخیری. در نمونه های تحت تیمار عصاره سلول ها وارد آپوپتوز اولیه ۱۵/۹۸ درصد و ۱۹/۶۴ درصد ثانویه شده اند.

## بحث

سرطان رشد بی‌رویه سلول‌ها است و از آنجایی که تکثیر غیرقابل کنترل سلولی و مقاومت آن به مرگ برنامه‌ریزی شده، ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی می‌باشند، بنابراین عاملی که باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود می‌تواند به عنوان یک ماده ضدسرطانی شناخته شود(۲۳-۲۲). با این حال، در دهه های اخیر مقاومت به شیمی‌درمانی مشکل بزرگی محسوب می‌شود و مطالعه‌ها نشان داده است که حداقل یک دوم کل سرطان‌ها به دلیل

ترکیب‌های موجود در رژیم غذایی ایجاد می‌گردند(۲۴). از این رو ترکیب‌های غذایی و ارتباط آنها با سلامت افراد، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است که پروبیوتیک‌ها از جمله این مواد می‌باشند و همان‌طور که گفته شد، میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زایی هستند که در سیستم گوارشی افراد وجود دارند و اثرات مفیدی بر میزبان دارند. مصرف پروبیوتیک‌ها منجر به تولید طیف وسیعی از محصولات تخمیری مانند غلظت بالایی از اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه می‌گردد(۲۵). در میان تمامی پروبیوتیک‌ها باکتری‌های خانواده لاکتوباسیلوس نظیر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس دلبورکی* از جمله مهم ترین اجزا فلور نرمال روده انسان و حیوانات می‌باشند. علاوه بر این نقش پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر تسهیل درمان سرطان کولورکتال به خوبی شناخته شده است(۲۶) و به همین دلیل امروز بیشتر مطالعه‌هایی در زمینه بررسی اثرات سمیت سلولی باکتری های پروبیوتیک در حال انجام است.

در مطالعه حاضر اثرات سمیت سولی عصاره سلولی باکتری کشته شده *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی رده سلولی سرطان کولون و نرمال HEc293 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثرات سمیت سلولی عصاره سلول باکتری در رده سلولی HT29 وابسته به دوز است و با افزایش غلظت سلولی، اثرات سمیت سلولی بیشتر می‌شود و بیشترین میزان سمیت سلولی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. هم‌چنین نتایج سمیت سلولی عصاره باکتری بر روی رده HE293 نشان داد که میزان سمیت آن بر روی این رده بسیار کمتر نسبت به رده سلولی HT29 است و تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنها توانسته است ۲۰ درصد سلول‌ها را از بین ببرد و ۸۰ درصد سلول‌ها زنده هستند. به نظر می‌رسد یکی از دلایل اثرات سمیت بیشتر بر روی سلول‌های سرطانی، میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرآیند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی است که شرایط مناسبی برای ترکیب‌های سلول باکتریایی جهت تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می‌کند. هم‌چنین یکی دیگر از دلایل، تفاوت موروفولوژیک سلول‌های سرطانی و طبیعی و هم چنین میزان منافذ سلولی است که همین اختلاف در شکل می‌تواند عاملی دیگر برای توجیه میزان سمیت سلولی باشد.

مطالعه‌های مختلفی بر روی بررسی اثرات سمیت سلولی پروبیوتیک‌ها بر روی رده‌های سلول سرطانی انجام شده است. بر طبق مطالعه انجام شده به وسیله تاونیتی و همکاران، سویه‌های باکتریایی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* سبب کاهش درصد بقای سلول‌های سرطانی HT29 و Caco-2 می‌شوند. نتایج این محققان نشان داد که اجزای سلولی باکتری‌های کشته شده با حرارت مانند دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان و سیتوپلاسم همه دارای اثرات سیتوتوکسیک در برابر سلول های سرطانی هستند (۲۷). سودا و همکاران

اثرات سمیت سلولی باکتری‌های مختلف لاکتوباسیل را بر روی سلول‌های سرطانی Caco-2 مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره سویه‌های باکتریایی لاکتوباسیل رشد سلول‌های سرطانی را به شیوه وابسته به دوز مهار می‌کند(۲۸). نتایج این مطالعه‌ها با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت از این جهت که عصاره سلولی سلول باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* به صورت وابسته به دوز باعث از بین رفتن سلول های سرطانی می‌شود.

یکی دیگر از اهداف مطالعه حاضر، بررسی اثرات آپوپتوزی عصاره سلولی *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی سلول‌های سرطانی HT29 بود. به طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردها در درمان سرطان به شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میتوکندری به وسیله پروتئین‌های Bax و Bak شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از آن و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می‌شود(۲۹). علاوه بر این پروتئین‌های Bcl2 و Bclxl با قرار گرفتن در سطح شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری و هسته از کنار هم قرار گرفتن پروتئین‌های Bax و Bakجلوگیری می‌نماید بنابراین فعالیت ضد آپوپتوزی نشان می‌دهند(۳۰). در مطالعه حاضر اثرات عصاره سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک *Bax* و کاهش بیان ژن *Bcl2* در سلول‌های سرطانی کولون و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نشان داده شد. بنابراین بررسی‌های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد که آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن‌ها می‌تواند مدرکی برای نقش آن در پیش گویی اختصاصی و دقیق تر پاسخ سرطان به درمان باشد؟ علاوه بر این، در بخش فلوسیتومتری، برای ارزیابی میزان آپوپتوز و نکروز القا شده به وسیله عصاره، از غلظت $IC_{50}$ استفاده شد. در این مطالعه نتایج فلوسیتومتری تأثیر عصاره سلولی باکتری نشان داد که این عصاره توانایی القای آپوپتوز را در سلول‌های سرطان کولون دارد. باید توجه داشت که بیشتر مطالعه‌های سال‌های اخیر در جهت یافتن داروهای ضدسرطانی می‌باشد که بتواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا کند تا بدون ایجاد التهاب آنها فاگوسیته شده و در نهایت از بین روند. نتایج حاصل از تحقیق‌هایبالدوین و همکاران نشان داد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌تواند باعث افزایش القای آپوپتوزیس در رده سلولی کارسینومای LS315 شوند و می‌توانند به عنوان ادجوانت با شیمی‌درمانی به کار گرفته شوند (۳۲ و۳۱). چیو و همکاران نیز با تحقیق‌های خود نشان دادند که ترکیب‌های محلول ترشح شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* باعث القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمیای مونوسیتی می‌شوند، درنتیجه می‌توان پروبیوتیک‌ها را به عنوان عاملی ایمن برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ‌گونه عارضه جانبی در پی ندارند(۳۳). در مطالعه دیگری نشان داده شد که مخمر ساکارومیسس

سرویسیه کشته شده با حرارت می‌تواند باعث وقوع آپوپتوز سلولی در سه رده سرطان سینه (MCF-7، ZR-75-1 و HCC70) شود. به علاوه نشان دادند که تزریق مستقیم داخل توموری مخمر ساکارومیسس سرویسیه کشته شده با حرارت می‌تواند باعث از بین رفتن قابل توجه تومور، القای آپوپتوز می‌شود(۳۴). تمامی نتایج مطالعه سمیت سلولی بر طبق نتایج مطالعه حاضر می‌باشد از این نظر که عصاره سلولی می‌تواند باعث القای آپوپتوز شود که در مطالعه ما با دو روش Real Time PCR و فلوسیتومتری تأیید گردید.

## نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزی عصاره سلولی لاکتوباسیلوس کازئی بر روی رده سلولی HT29 و میزان سمیت کمتر بر روی سلول‌های نرمال HE293، امید است که در آینده با انجام مطالعه‌های بیشتر بتوان از این باکتری به عنوان مکمل دارویی در درمان و پیشگیری از سرطان کولون استفاده نمود.

## تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی اجرا شده است. بدین وسیله از تلاش همکاران دانشگاه آزاد اسلامی و آقای آرین رحیمی که در انجام این پروژه همکاری نموده اند تشکر و قدرانی می‌نماییم.

**REFERENCES**

1.Kich DM, Vincenzi A, Majolo F, Volken de Souza CF, Goettert MI. Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention. Nutr Hosp 2016; 29; 33(6):1430-7.
2.Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. Benef Microbes 2015; 6(2): 209-17.
3.Whelan K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2011; 14(6): 581-7.
4.Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. Clin Ther 2008; 30(3): 453-68.
5.Abad CL, Safdar N. The role of lactobacillus probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections--a systematic review. J Chemo 2009; 21(3): 243-52.
6.Falagas M, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. Clin Microbiol Infect 2007; 13(7): 657-64.
7.Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic. J Dairy Sci 2001; 84(2): 319-31.
8.DE Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Adv Biochem Eng Biotechnol 2008; 111: 1-66.
9.Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. Benef Microbes 2015; 6(2):209-17.
10.Bernstein CN. Antibiotics, probiotics and prebiotics in IBD. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 2014; 79: 83-100.
11.Gupta V, Garg R. Probiotics. Indian J Med Microbiol 2009; 27(3): 202-9.
12.Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur J Pharm Sci 2002; 15(1): 1-9.
13.Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium Lactobacillus plantarum 5BL. Microbiol and Immun 2014; 58(9): 492-502.
14.Hassan Z, Mustafa S, Rahim RA, Isa NM. Anti-breast cancer effects of live, heat-killed and cytoplasmic fractions of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus hominis* isolated from human breast milk. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2016; 52(3): 337-48.
15.Tauriello DV, Calon A, Lonardo E, Batlle E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. Mol Onco 2017; 11(1): 97-119.
16.Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. Lactis 44 Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. Anaerobe 2014; 30: 51-9.
17.DE Vrese M, Marteau PR. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. J Nut 2007; 137(3): 803S-11S.
18.Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, Ikuta K, Akutsu H, Tanabe H, Kohgo Y. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. Nat Commun 2016; 10; 7: 12365.
19.Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4): 495-516.
20.Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Euro J Endocrin 1998; 138(5): 482-91.
21Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2002; 277(52): 50959-65.
22.Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med 2016; 13(1): 120-35.
23.Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental and Clin Cancer Res 2011; 26; 30:87.
24.Ross SA. Evidence for the relationship between diet and cancer. Exp Onco 2010; 32(3): 137-42.
25.Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J Am Diet Assoc 2001; 101(2): 229-38.
26.Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. World J Gastro 2014; 28; 20(24): 7878-86.

27.Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept. J Genes and Nutr 2011; 6(3): 261–74.
28.Sevda ER, Kopara AT, Kivance M. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. J Biol 2015; 39(1): 23-30.
29.Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Ann Hemat 2005; 84(10): 627-39.
30.Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. Journal of Allergy, Clin Immuno 2001; 108(4):S99-103.
31.Lund PK, Westvik AB, Joø GB, Øvstebø R, Haug KB, Kierulf P. Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes. J Immunol Methods 2001; 252(1-2): 45-55.
32.Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M. Probiotic Lactobacillus acidophilus and L. casei mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. Nutr and Cancer 2010; 62(3): 371-8.
33. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2002; 27; 277(52):50959-65.
34.Ghoneum M, Gollapudi S. Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. Anticancer Res 2004; 24(3a):1455-63.

# Cytotoxicity Effect of *Lactobacillus casei* Cell Extract as Indigenous Probiotic Bacterium on Colon Cancer Cell Line (HT29) and Analysis of *Bax* and *Bcl2* Apoptosis Gene Expression

**Ali Asgari E[1], Mirzaie A[2*], Noorbazargan H[3], Bagheri Kashtali A[4]**

[1]Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [2]Young Researchers Club and the Elite, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, [3]Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, [4]Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Received: 18 Jan 2017 Accepted: 25 Feb 2017

## Abstract

**Background and aim**: Nowadays, the probiotic bacteria such as lactobacilli are known as preventing factors the development of many diseases including cancer. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of *Lactobacillus casei* PTCC 1608 cell extract as probiotic bacteria on colon cancer cell line (HT29) and analysis of *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression.

**Methods:** In this experimental study, the cell extract of heat killed *L. casei* was prepared at 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 µg/ml concentration. The cytotoxicity of various cell extracts on HT29 and HEC293 cell lines were evaluated in 24 hours using MTT assay. Moreover, the *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression level in HT29 cell line was analyzed using Real Time PCR. The apoptotic effects of cell extract was determined using Flow-cytometry technique. Finally, the collected data were statistically analyzed using one-way analysis of variance with the SPSS/18 software.

**Results:** The results of MTT assay showed that cell extracts *of L. casei* was able to reduce the survival rate of HT29 cell line to 0.95±0.44, 73.45±0.21, 51.49±0.87, 39.5±0.45 and 19.7±0.55. Also at the same concentrations in HEC293 cell lines resulted in survival decreased rate of 98.67±056, 94.31±0.87, 26/0 ± 1/92.1±0.26, 91/89.91±0.42, 34/8434±0.55, 29/79.29±0.49. In addition to the Real Time PCR results the expression level of *Bax* and *Bcl2* was increased and decreased in HT29 cell line respectively (2.76 ± 0.54 ($P<0.05$), 0.21 ± 0.43 ($P< 0.05$)) in 24 hrs. Moreover, the flow cytometry results indicated the 35.62 % apoptosis in HT29 cell line treated with IC50 value.

**Conclusion:** The results show that the cell extract of *L. casei* PTCC 1608 could induced the apoptosis in HT29 cell line and it had low toxicity on HEC293 cell line. Therefore, it seems that *L. casei* has potential uses as probiotic for pharmaceutical applications including prevention and treatment of colon cancer.

**Key words:** *Lactobacillus casei*, Probiotic, HT29 cell line, Cytotoxicity, Apoptosis

[*]**Corresponding author**: **Mirzaie A**, Young Researchers Club and the Elite, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
**E mail**: Amir_mirzaie92@yahoo.com

**Please cite this article as follows:**
Ali Asgari E, Mirzaie A, Noorbazargan H, Bagheri Kashtali A. Cytotoxicity Effect of Lactobacillus casei Cell Extract as Indigenous Probiotic Bacterium on Colon Cancer Cell Line (HT29) and Analysis of Bax and Bcl2 Apoptosis Gene Expression. Armaghane-danesh 2017; 21 (12): 1192-1206.