بررسی تاثیر کشت هم جوار باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز بر میزان بیان ژن های casp3 و bax در سلول های سرطانی کولون HT29

آناهیتا زیبا سازطالبی[1]، چنگیز احمدی زاده*[1]

۱) گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۹

چکیده

مقدمه: سرطان کولون در کشورهای توسعه یافته شیوع یافته است. باکتری های پروبیوتیک، نقش مهمی در کاهش ابتلا به سرطان کولون و درمان سرطان کولون را می توانند ایفا کنند هدف از این مطالعه بررسی تاثیر کشت هم جوار باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز بر میزان بیان ژن های casp3 و bax در سلول های سرطانی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی پس از کشت باکتری ها، مایع رویی و عصاره باکتریایی تهیه شده و سلول ها توسط این مواد تیمار شدند. اثرات سمیت سلولی عصاره سلول باکتری روی رده سلولی HT29 با استفاده از روش MTT بررسی شد. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA، میزان بیان ژن های bax، casp3 در رده سلولی HT29 با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج آزمایش MTT نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوز در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث کاهش بقای سلول HT-29 به میزان ۸/۳۲±۵۱/۴۹ درصد شد و نتایج رنگ آمیزی دپی نشان داد تیمار سلول های HT29 با باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز باعث تغییرات کیفی آپـــوپتوز سلـــولی می شود. نتایج Real time PCR نشان داد که باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز سبب افزایش معنی دار بیان ژن های bax (۲/۲۲±۴/۰) وcasp3 (۸۸/۱۲±۶/۰) در مقایسه با ژن کنترل در سلول های سرطانی کولون HT29 شد($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز میزان بیان ژن bax, cas3 را افزایش داده و سبب القای آپوپتوز در رده سلولی HT29 می شود. بنا بر این با انجام مطالعه های بیشتر می توان از این باکتری به عنوان یک محصول پروبیوتیک ضد سرطان در درمان و پیشگیری از سرطان کولون استفاده نمود.

واژه های کلیدی: سرطان کولون، بیان ژن، لاکتوباسیلوس رامنوز

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

Email:dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

یکی از شایع ترین 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(۱). در آزمایش های برون تنی نشان داده شده که پروبیوتیک ها در سرکوب زخم اولیه نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ در مدل های موش نقش دارند(۲). هم چنین یکی از مکانیسم های عملکردی پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیلوس ها خاصیت ضد تکثیری سلول های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است(۳). عوامل مختلفی می توانند به عنوان عامل سرطان روده بزرگ در نظر گرفته شوند از جمله عوامل ژنتیکی، محـــیطی و رژیم غـــذایی(۴،۵). بیشتر پروبیوتیک ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری های اصلی فلورمیکروبی روده انسان می باشند و در آن جا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند معمول ترین میکروارگانیسم های پروبیوتیکی به دو گروه باکتری ها و قارچ ها تقسیم می شوند باکتری لاکتوباسیوس رامنوز یکی از تجاری ترین پروبیوتیک دنیا به عنوان ضد سرطان پیشنهاد شده است ولی هنوز مکانیسم دقیقی از نحوه تاثیر آن نشان داده نشده است. علاوه بر تنظیم هومئوستازی اپیتلیال روده و پاسخ های ایمنی، برخی پروبیوتیک ها توسط محققین گزارش شده اند که مکانیسم های ضد سرطانی را فعال می کنند. Altonsy و همکاران القاء مســـیر میـــتوکندریایی آپوپتوزیس در سلول های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیـــوتیـــک های مثل Lactobacillus rhamnosus، Bifdobacteriumlactis، را گـــزارش نموده اند(۶). نتایج به دست آمده توسط Baldwin و همکـــاران نشـــان می دهـــد که Lactobacillus acidophilus و Lactobacillus casei قادرند توان القایی آپوپتوزیس ۵-فلورویوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال ۱۵LS5 افزایش دهند، بنا بر این پیشنهاد شده است که از این پروبیوتیک ها به عنوان ادجوانت در شیمی درمانی ممکن است استفاده شود(۷). مرگ سلول ها بی ثبات از نظر ژنومیک از طریق آپوپتوزیک فرآیند تظیمی مهم در برابر سرطانی شدن سلول ها است. سرطان در نتیجه تغیرات متعدد در چندین ژن مخـــتلف به وقـــوع می پیوندد از جمله ژن های مهمی که در ســـرطان کولون درگیرند، bax و caspase3 می باشد. آپوپتوز از دو طریق داخلی و خارجی سبب فعال شدن گروه خاصی از پروتئازهای وابسته به آسپارتات به نام کاسپازها به خصوص caspase3 می شود در مسیر خارجی با افزایش فاکتور ایجادکننده نکروز TNF کاسپاز های داخل سلولی فعال می شود در حالی که در مسیر داخلی به عنوان مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می شـــود با تغیـــیر نسبی واسطه های پروآپوپتوتیک(مانند bax) نفوذپذیری غشای میتوکندری به سیتو کروم C افزایش یافته و با رهاسازی آناپوپتوزوم شکل گرفته و سبب فعال شدن casp می شود(۸،۹). کاسپازها، پروتئازهای اختصاصی هستند و سوبسترای خود را ازمحل آسپارتات خاصی، که با توانایی casp سازگار است تجزیه می کنند و باعث تخریب پروتئین ها یا فعال سازی casp دیگر می شوند. تمام کاسپازها به وسیله رویداد تجزیه ای پروتئازی فعال می شوند. casp فعال تترامری شامل دو زیر واحد بزرگ و دو زیر واحد کوچک است(۱۰). کاسپازها را از نظر تقدم و تاخر شرکت در فرآیند مرگ سلولی به دو دسته آغـــازگر و اجـــرایی دسته بندی می کنند. کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز ۸، در ابتدای فرآیند فعال می شوند و کاسپازهای اجرایی مانند casp3 در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغـــازگر فعال می شوند و آبشار کاسپازی را به راه می اندازند(۱۱-۲، ۱).

Yan و همکاران با تحقیق های خود نشان دادند که ترکیب های محلول ترشح شده از لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس رامنوسوس باعث القای آپاپتوز در سلول های لوکمیای مونوسیتی می شود در نتیجه می توان پروبیوتیک ها را به عنوان عاملی ایمن برای برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ گونه عارضه جانبی در پی ندارد(۱۳).

پروبیوتیک ها از طریق تحریک سیستم ایمنی بدن، از بین بردن آنزیم های مخـرب و سرطان زا مثل

اسیدهای صفراوی ثانویه و مواد موتاژنی که توسط باکتری های روده ایجاد می شوند، می توانند در جلوگیری ازسرطان کولون نقش مهمی بازی کنند(۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر کشت هم جوار باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز بر میزان بیان ژن های casp3 و bax در سلول های سرطانی کولون HT29 می باشد.

مواد و روش ها

در این مطـــالعه تجربی آزمایـــشگـــــاهی که در مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی علوم پزشکی تبریز، در سال ۱۳۹۶ انجام شده است رده سلولی HT29 از بانک سلولی پاستور تهیه شد و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه و در محیط کشت mrs آگار(De Man Rogosa and Sharp agar)کشت داده شدند. جهت تهیه باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز در محیط کشت mrs agar به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند به دنبال آن از سوسپانسیون با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب تهیه شد و مایع رویی جدا شد. رسوب تهیه شده چندین بار با PBS شست و شو داده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. ابتدا سلول ها در محیط کشت RPMI1640 (Gipc، آمریکا) غنی شده با(1.0 µg/µL پنـــی سیـــلین- µg/µL1.0 استرپتومایسین) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی(Fetal Bovine Serum: FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد رطوبت قرار داده شدند. به منظور بررسی اثر کشندگی عصاره سلولی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز روی رده سلولی HT29 از روش رنگ سنجی MTTSigma (Aldrich، آلمان) استفاده شد(۱۵).

غلظت هـــای ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱µg/ml از عصاره سلولی باکتری کشته شده در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT29 تیمار شدند بعد از گذشت زمان فوق محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT (MicrocultureTetrazoliumTest) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط CO2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شد سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال های فورمازان تولید شده و به وسیله سلول های زنده در ایزوپروپانول حل گردید

رنگ آمیزی سلولی دپی(Dapi staining): بعد از تیمار همه سلول ها به مدت ۲۴ ساعت پارافرمالدهید به هر چاهک اضافه شد سپس مایع رویی سلول ها خالی شد، سلول های داخل هر چاهک ۳ بار با PBS شستشو داده شد و سلول های داخل هر چاهک را با ۶۰ ماکرولیتر محلول نفوذپذیرکننده تریتونایکس ۱۰۰ (Triton x-100) ۱ درصد نفوذپذیر گردید. سلول ها را ۳ بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده و سپس به سلول های داخل هر چاهک ۵۰ ماکرولیتررنگ DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) اضافه شد. سلول ها با میکروسکوپ فلورسانت Olympus IX81 invert مجـهز به Olympus DP70 (Corp, camera (Olympus) ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفتند در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا(Biotek، آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشتدگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد(۱۶).

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

هم چنین میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی(Half maximal inhibitory concentration یا IC50) نیز محاسبه شد(۱۶). میزان بیان ژن های casp3 و bax در سلول های سرطانی کولون HT29 با استفاده از روش Real time PCR سنجیده شد. با استفاده از کیت استخراج RNA در ابتدا کل RNA های تیمار شده و نشـــده با استـــفاده از کیت استخراج RNA(فرمانتاز، آلمان) طبق دستور العمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Nanodrop ND1000، آمریکا) اندازه گیری شد.

سنتز cDNA ۱ میکروگرم از total RNA که با ۰/۲ ماکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ ماکرولیتر ۱۰ mM dNTP و آب DEPC مخلوط کرده با حرارت ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد، سپس ۵ یونیت آنزیم RT (MMLV) ساخت شرکت Thermo Fisher، بافر ۱ buffer for MMLV RT (x)، یک یونیت بر

ماکرولیتر مهارگر RNase را افزوده و در واقع در انتها حجم کلی هر تیـــوب باید ۲۰ ماکرولیتر شود. بعد تیوب ها را در دستگاه PCR قرار تا cDNA ها سنتز شود(۱۷).

ابتدا برای این بررسی تغییرات متیلاسیون بر روی DNA های مورد مطالعه از طریق کیت EZ-96 DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Irvine, CA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن استفاده شد به طور خلاصه غلظت های ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰ میکرولیتر از DNA دچار تغییر متا بی سولفیته شده تهیه شد. غلظت ۱/۲۰ به عنوان الگو برای Real time PCR استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت، واکنش تکثیری در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۰ لانـــدا از محـــلول اصلی (Master Mix) ، ۰/۴ لاندا از پرایمر Forward، ۰/۴ لاندا از پرایمر Reverse، ۵ لاندا از DN متابی سولفیته شده و ۴/۲ لاندا آب مقطر می باشد. پس از اعمال تغییرات برای اندازه گیری میزان متیلاسیون ژنی از دستگاه Eco شرکت Eco Biosystems استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوطه با استفاده از نـــرم افـــزار oligo 5طراحی شده و توسط شرکت بایونیر (Bioneer، آلمان) ســـنتز گـــردید و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مـــورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای استـــفاده شده برای ژن های cas و bax در ایـــن مـــطالعه بـــه ترتـــیب زیـــر می باشد:

Forward : 5'–TCCCAGTCAGAGGCGCTATG-3' و Reverse :5'_CACAAACTGAGGATTGCAAGTTC-3'

Forward 5'-GAT GCG TCC ACC AAG AAG-3' و Reverse 5'-AGT TGA AGT TGC CGT CAG- 3'

واکنش تکثیری برای ۴۰ سیکل بر طبق الگوی دمائی زیر انجام شد:

فعال سازی آنزیم(Hot start) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. دناتوراسیون اولیه و Holding در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، انجام شد. طویل سازی در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۲۵ ثانیه صورت گرفت. جذب نور نیز در این دما صورت گرفت. بعد از این مراحل مرحله Melting در دمای ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد تا باندهای DNA های تحت تاثیر متابی سولفیت از نظر تمایز دمایی با قدرت تشخیصی بالا(HRM) تفکیک شوند واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ Eva green I انجام شد. رنـــــگ Eva green (Fermentas, France) بعد از انجـــام واکنـــش های Real PCR Time، محصولات حاصل بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شده، سپس از اتیدیوم بروماید(Merck، Germany) برای رنگ آمیزی DNA جهت مشاهده قطعات در برابر نور ماوراء بنفش روی ژل استفاده شد و در نهایت توسط دوربین پلارویید عکسبرداری انجام گرفت

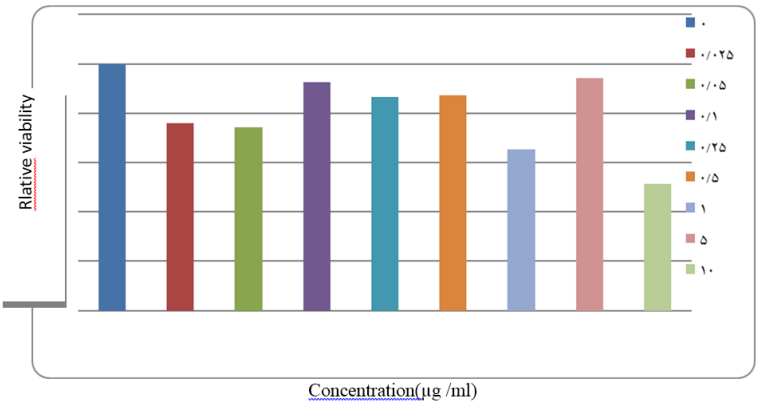
Real time RT-PCR: واکنـــــش Real time PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب‌های مخصوص Real time PCR 1 ماکرولیتر cDNA و ۱۹ ماکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمر فوروارد(۰/۲ ماکرو مولار)، ۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز(۰/۲ ماکرو مولار)، ۷ ماکرولیتر DEPC water و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 2x Real time(Bimake، آمریکا) ریخته شد. بعد تیوب ها را در دستگاه Real time PCR قرار داده و دستگاه run گردید. بیان ژن bax، casp3 در نسبت به بیان ژن GAPDH اندازه گرفته شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط کالیبراتور داخلی(نمونه های کنترل هر آزمایش) استانداردسازی شدند. لازم به ذکر است که با رقت سازی یک از نمونه ها، منحنی رسم گردید.

آنالیز آماری داده ها: تجزیه داده ها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد. برای مقایسه میانگین گروه ها از آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) استفاده گردید. آزمون ها زمانی معنی دار در نظر گرفته شدند که مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بود و سپس نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن رفرنس(GAPDH) محاسبه شد. فرمول محاسبات به شرح ذیل بود(۱۸).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(control-sample)}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(control-sample)}}$$

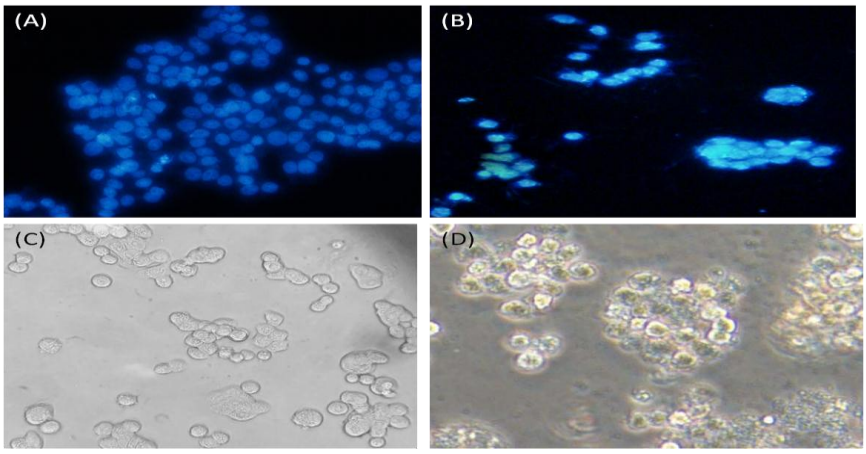
یافته های پژوهش

تیمار سلول های HT29 با غلظت های مختلف ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از تست MTT طی ۲۴ ساعت کاهش بقای زیستی سلول ها را به ترتیب ۱۰۰±۵/۷، ۷۵/۳±۸۴/۰۱، ۷۴/۵±۴۳/۰۹، ۹۲/۲±۷۰/۴۶، ۸۶/۳±۴۸/۴۴، ۷۸/۶±۱۸/۱۲، ۶۵/۱±۴۶/۵، ۹۴/۱۲±۳۲/۶، ۵۱/۸±۴۹/۳ شد. سلول های HT29 تحت تاثیر غلظت های مختلف باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز قرارگرفتند.



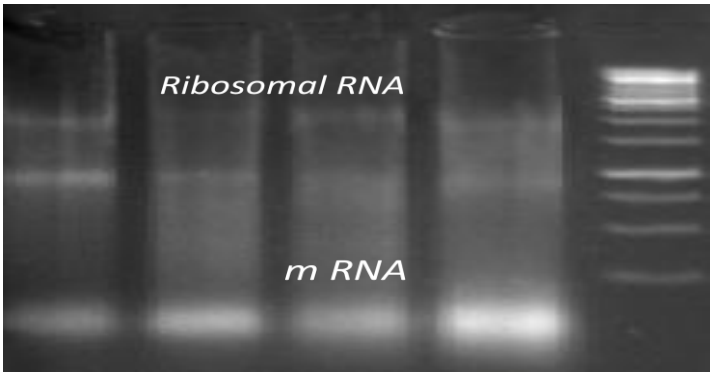
نمودار شماره ۱. درصد بقای سلول های HT29 در برابر غلظت های مختلف عصاره باکتری کشته شده در مدت زمان ۲۴ ساعت

هم چنین نتایج نشان می دهد که عصاره سلولی لاکتوباسیلوس رامنوز در غلظت ۵ µg/ml بیشترین مهار سلولی را داشته اند که از لحاظ آماری معنی دار می باشد($P<0.05$). هم چنین طبق روش ذکر شده در فصل مواد و روش ها پس از تیمار سلول ها به منظور بررسی اپوپتوز سلول ها رنگ آمیزی dapi انجام شد شکل شماره ۱ سلول های رنگ شده و غیر رنگ شده توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت تصویر برداری شده است نشان داده است.



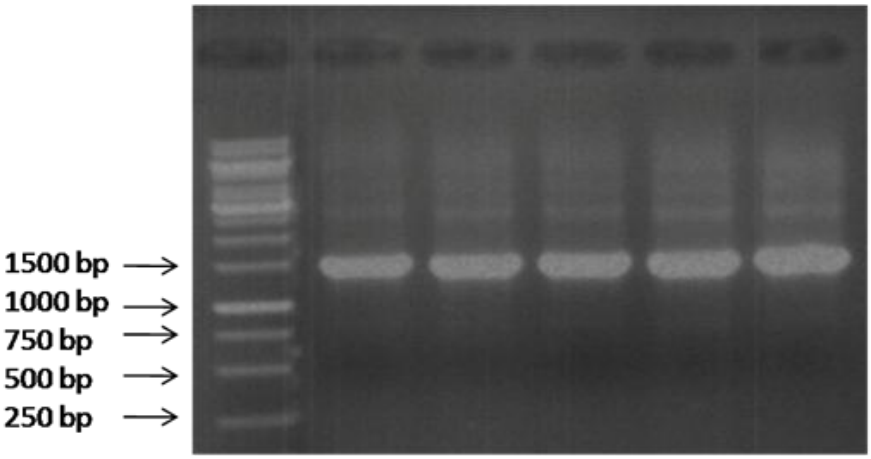
شکل شماره ۱. رنگ آمیزی سلول های تیمار شده با رنگ dapi. تصویر میکروسکوپی سلول های HT29. سلول های HT29 در حضور باکتری زنده مسیر اپوپتوز را انتخاب نموده اند.: A رنگ آمیزی dapi و تصویر میکروسکوپی فلورسنت هسته های سلول سالم و کنترل. :B رنگ آمیزی dapi و تصویر میکروسکوپی فلورسنت هسته های سلول تیمار شده و اپوپتوز. C: تصویر میکروسکوپی سلول های کنترل D: تصویر میکروسکوپ نوری سلول های اپوپتوز

ارزیابی کیفی RNA استخراج شده: به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن ها، سلول های HT29 تحت تاثیر غلظت IC50 باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز در آزمون MTT به دست آمده بود قرار گرفتند. سپس RNA این سلول ها به شیوه ای که در بخش مواد و روش ها شرح داده شد استخراج گردیدند. سپس غلظت RNA نمونه ها با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد.



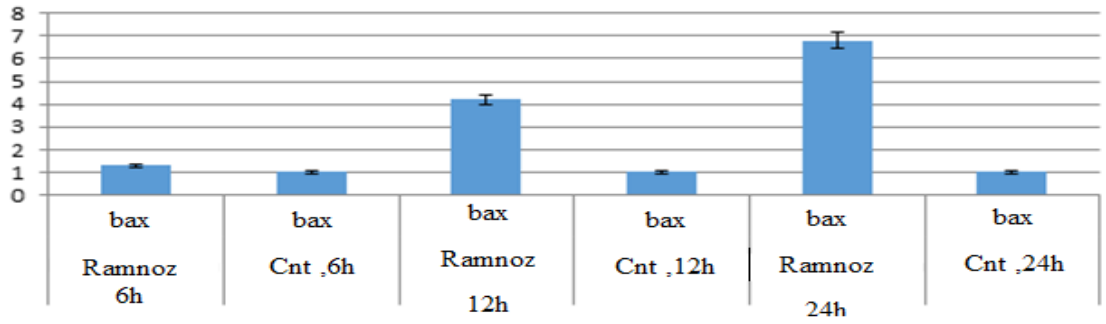
شکل شماره ۲. ژل الکتروفورز total RNA استخراج گردیده نمونه ها. جهت کنترل کیفیت RNA های استخراج شده، نمونه ها بر روی ژل الکتروفورز شدند. مطابق شکل، RNA های استخراج گردیده دارای کیفیت مطلوبی می باشند.

انجام واکنش زنجیره ای PCR برای ژن 16Srdna: انتظار بر آن است که پس از انجام PCR قطعه تکثیری برای ژن ۱۵۰۰ جفت باز آورده شده است. پس از انجام PCR در آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و نتیجه الکتروفورز در شکل شماره ۳ آورده شده است. باند شارپ نشان دهنده تکثیر اختصاصی می‌باشد.

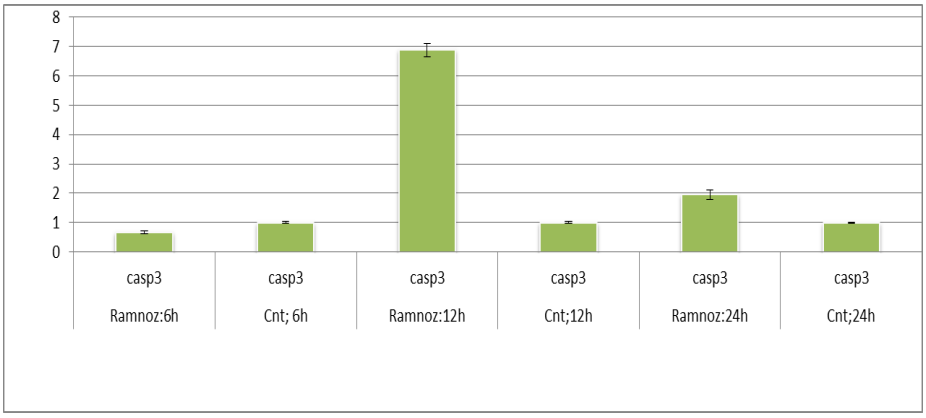


شکل شماره ۳. الکتروفورز آگارز ۱ درصد ژن 16 S rDNA باکتری های لاکتوباسیل رامنوز جداسازی شده از نمونه مدفوع لدر مورد استفاده kb ۱شرکت ترموفیشر می باشد.

آنالیز تغییر بیان ژن های bax, cas3 در سلول HT29 تیمار شده با غلظت سمیت ۵۰ درصد(IC50) عصاره سلولی بعد از ۲۴ ساعت با روش Real Time PCR انجام شد. نسبت بیان ژن های bax, cas3 به ژن GAPDH در رده سلولی سرطانی HT29 با عصاره باکتری به ترتیب ژن bax ۱/۰±۲۸/۰۴۱، ۴/۰±۲/۲۲، ۶/۰±۸/۱۵ و ژن casp3، ۰/۰±۶۶/۰۵۱، ۶/۰±۸۸/۱۲ ۱/۰±۹۵/۱۷ که ژن bax در ۲۴ ساعت و ژن casp3 در ۱۲ ساعت بیشترین افزایش بیان را دارند(اعداد به دست آمده میانگین ۳ بار تکرار می باشند).



نمودار شماره ۲. میزان بیان ژن Bax در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز(P=0.003)



نمودار شماره ۳. میزان بیان casp در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز(P=0.001)

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های رامنوز میزان بیان ژن های bax و cas3 را افزایش داده است این تغییرات در بیان این ژن ها در جهت کشانده شدن سلول های سرطانی به سمت آپوپتوز بود و در کل با توجه به تست کیفی آپوپتوز توسط روش های رنگ آمیزی دپی مشاهده گردید. پروتئین های BCL-2 که به عنوان ضد اپاپتوزی عمل می کنند. یک پارچگی غشای میتوکندری را حفظ می کنند و آزاد شدن سیتوکروم c به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن cas3 را تنظیم می کند. Altonsy و همکاران القاء مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیز در سلول های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیوتیک های مثبت Lactobacillus rhamnosus، Bifdobacteriumlactis، commensalbacteria-Escherichiacoli و Atopobiumminutum را گزارش داده اند(۶). در مطالعه دیگری گزارش شده است که پروبیوتیک (exopolysaccharides)EPS در مرگ سلول های Lactobacillus Acidophilus سرطانی کولون از طریق autophagy درگیرند که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۱۹). Roberfroid و همکاران در مطالعه خود بیان کرده است symbiotic در واقع مخلوطی از پروبیوتیک و prebiotics ممکن است بسیار موثرتر از تنها پروبیوتیک و یا تنها prebiotic در پیشگیری از سرطان های کلورکتال باشد(۲۰). Iyer و همکاران در مطالعه ای به این نتیجه رسیدند که Lactobacillusreuteri آپوپتوزیز القاء شده توسط TNF در سلول های مشتق از لوسمی

میلوئید مزمن انسانی را که از طریق تعدیل پیام رسانی MAPK و NF-κB و کاهش پروتئین هایی که تکثیر سلولی(cyclin D1 and COX-2) یا مـــهار آپوپتوزیز(Bcl-2, Bcl-xL) را میانجی گری می کنند، افزایش می دهد(۲۱). Chiu نشان داده است که فاکتورهای محلول باکتریایی(LcrS) ترشح شده توسط Lactobacilluscaseirhamnosus آپوپتوزیز رده سلولی لوسمی monocytic انسانی(THP-1) را القاء می کند(۲۲). مطالعه Leu نشان داد که سلول لاکتوباسیلوس کشته شده توسط حرارت، تاثیر مهاری بر بقای سلول های سرطانی روده و سینه داشت که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۲۳). Montalto و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که باکتری های کشته شده و سوپرناتانت آن ها در مقایسه با سلول های زنده نیز می توانند اثرات ضد سرطانی داشته باشند که یکی از مکانیسم ها کاهش نفوذپذیری روده است که با مطالعه ما هم خوانی دارند(۲۴). شواهد نشان می دهد که تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مثل پروپیونیک اسید، استیک اسید و بوتیریک اسید مکانیسم مهم و مفید دیگـــری اســـت که توسط پروبیـــوتیک ها و پری بیوتیک ها تولید می شوند به طوری که بوتیرات سبب ممانعت از تکثیر سلول های سرطانی شده و آپوپتوز را القا می کند که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۱۳–۲۵). Pan و همکاران اثرات تجویز دهانی باکـــتری هـــای(Lactobacillus acidophilus L.acidophiles)را روی کنســـرهای کولورکتال موش ها تجزیه و تحلیل نمودند. نتایج نشان دلالت بر آن داشت که L.acidophiles شدت کارسینوژنز کلورکتال را کاهش دادند و از طرفی مرگ برنامه ریزی شده سلولی را در موش های تیمار شده افزایش دادند که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۲۶). مطالعه دیگر صورت گرفته توسط بالدوین و همکاران نشان دادند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی می توانند سبب افزایش القای آپوپتوز در رده سلولی کارسینومای LS315 شوند و می توانند به عنوان ادجوانت با شیمی درمانی به کار گرفته شود(۲۷).

Ashkenazi و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که سیتوکروم با واکنش با Apaf-1 در سیتوپلاسم منجر به فعال شدن caspase–9 نیز فعال procaspase-3 می شود که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۲۸). بر طبق مطالعات انجام شده توسط Taverniti و همکاران .L. Casei, L ,plantarum bulgaricus سبب کاهش درصد زیستایی سلول های HT-29 شدند. مطالعات نشان داده است که اجزای متفاوتی از باکتری ها نظیر دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان، سیتوپلاسم و حتی باکتری کامل کشته شده توسط حرارت همه دارای اثرات پیشـــگیرانه در برابر رده سلول های سرطانی می باشند. چون توجه آن ها بیشتر بر سیستم ایمنی بدن معطوف بود، آن ها به این نتیجه رسیدند که باکتری کشته شده ایمن تر و با ثبات تر بوده و دارای اثری متشابه با انواع زنده آن است(۲۹). Vermeulen و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که مسیر مرگ سلولی می تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میـــتوکنـــدری به وسیله پروتئین های bax شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از آن و نهایتاً فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ می شود که با مطالعه ما هم خوانی دارد(۳۰).

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز میزان بیان ژن bax, cas3 را افزایش داده و سبب القای آپوپتوز در رده ســـلولی HT-29 می شود بنا بر این با انجام مطالعه های بیشتر می توان از باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز به عنوان یک محصول پروبیوتیک ضد سرطان در درمان و پیشگیری از سرطان کولون استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم آناهیتا زیبا ساز دانشجوی رشته میکروبیولوژی می باشد که در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه آزد اسلامی واحد اهر با کد ۲۲۰۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۳ مورد تصویب معاونت پژوهش و فناوری قرار گرفته است بدین وسیله از زحمات معاونت پژوهش و فناوری تشکر و قدردانی می گردد.

References

1.Kich DM, Vincenzi A, Majolo F, Volken CF, Goettert MI. Probiotic nutrition in cancer treatment and prevention. 2016; 29; 33: 1430-7. doi.10.20960/nh.806.

2.Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. Benef Microbes2015; 6: 209-17. doi.10.3920/BM2014.0067.

3. Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillusprobio tics for bacterial genitourinary infections in women a review. Clin Ther 2008; 30: 453-68. doi.10.1016/j.clinthera.2008.03.013.

4. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor the rationale for cancer therapy. Oncologist.2002; 7: 2-8. doi.10.1634/theoncologist.7-suppl_4-2

5. Grandis JR, Sok JC. Signalling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. Pharmacol Ther2004; 102: 37-46. doi.10.1016/j.pharmthera.2004.01.002.

6. Altonsy MO, Andrews SC, Tuohy KM. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells by Atopobium, and commensal probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. Int J Food Microbiol2010; 137: 190-203. doi.10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.015.

7. Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, et al. Lactobacillus acidophilus and L. casei mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fuorouracil-induced apoptosis. Nut Cancer2010; 62: 371-78. doi.10.1080/01635580903407197.

8. Bayir H, Kagan VE. Bench to bedside review mitochondrial injury oxidative stress and apoptosis there is nothing more practical than a good theory. Crit Care2008; 12: 206. doi.10.1186/cc6779.

9. He B, Lu N, Zhou Z. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. Curr Opin Cell Biol 2009; 21:900-12. doi.10.1016/j.ceb.2009.08.008.

10. Steller H. Artifical death switches induction of apoptosis by chemically induced caspasemultimerization. Proc Natl Acad Sci USA 1998 12; 95: 5421-2. doi.10.1073/pnas.95.10.5421.

11. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther2001; 92: 57-70. doi.10.1016/S0163-7258(01)00159-0.

12. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 10; 276: 1445-9. doi.10.1126/science.7878463.

13.Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 2002; 27; 277:50959-65. doi: 10.1074/jbc.M207050200.

14. Mahmoudiaslzadeh H, Fazeli M, Eaidi A, Samadi N, Jamalifar H, Parsaseresht L. [Study of probiotic effect of Bifidobacterium bifidum on CacoII cancer cell line]. Iran J Bio2013; 26:378-85. (Persian)

15. Yonesi, B. Mirzaie, A Aliasgari E. [Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line HT29 and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method]. JCT 2018; 8:22-9. (Persian)

16. Baharara J, Ramezani T, Divsalar A, Mousavi M, Seyedarabi A. Induction of apoptosis by green synthesized gold nanoparticles through activation of caspase-3 and 9 in human cervical cancer cells. Avicenna J Med Biotechnol2016; 8:75-83.

17. Peterson SM, Freeman JL. RNA isolation from embryonic Zebrafish and cDNA synthesis for gene expression analysis. J Vis Exp 2009; 30: 1470. doi.10.3791/1470.

18. Sattari Sh, Ahmadizadeh Ch. [The study of expression of PTEN and AKT1 genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with Streptococcus thermophiles]. Feyz2019; 22: 624-31. (Persian)

19.Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2008; 9:47-59. doi. 10.1038/nrm2308

20. Roberfroid MB. Prebiotics and synbiotics concepts and nutritional properties. Br J Nut 1998; 80: 197-202.

21. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, et al. Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF induced apoptosis in human myeloid leukemia derived cells by modulation of NF kappaB and MAPK signalling. Cell Microbiol2008; 10: 1442-52. doi.10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x.

22. Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of an apoptosis of monocytes by Lactobacillus caseirhamnosus soluble factors ClinNutr. 2010; 29: 131-140. doi.10.1016/j.clnu.2009.07.004.
23. Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in Rats. J Carcin 2010; 31:246-5110. doi.10.1093/carcin/bgp197.
24. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Nicuolo F, et al. Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. J Dig 2004; 69:225-8. doi.10.1159/000079152.
25. Baricault L, Denariaz G, Houri JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. Use of HT29 a cultured human colon cancer cell line to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. J. Carcin 1995; 16:245-52. doi.10.3390/ijms9050854.
26. Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. Food Cont2009; 20: 598-602. doi.10.1016/j.foodcont.2008.08.019.
27. 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. Nut Cancer2010 5; 62:371-8. doi.10.1080/01635580903407197.
28. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Leverson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. Nat Rev Drug Dis2017; 16:273. doi.10.1038/nrd.2016.253
29. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability. J Gen Nut2011; 6:261-74. doi.10.1007/s12263-011-0218-x
30. Vermeulen K, Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis mechanisms and relevance in cancer. Ann Hemat 2005; 84: 627-39. doi.10.1007/s00277-005-1065-x.

The Study of Expression of Casp3/Bax Genes in HT29 Colon Cancer Cell Line with Lactobacillus rhamnosus Co-Culturing

ZibasazTalebi A[1], Ahmadizadeh Ch[1]*

(Received: 28 September, 2019 Accepted: 28 April, 2020)

Abstract

Introduction: Colon cancer has spread to developed countries. Probiotic bacteria can play an important role in reducing cancer and treating colon cancer. The aim of this study was to determine the effect of adjacent bovine Lactobacillus rhamnose culture on the expression of casp3 and bax genes in cancer cell.

Materials & Methods: In this experimental study after bacterial culture, supernatant and bacterial extract were prepared and the cells were treated with these materials. The effects of cell cytotoxicity of the cell line on the HT29 cell line were investigated using MTT method. After extraction of RNA and preparation of cDNA, the expression of bax, casp3 genes in the HT29 cell line was investigated using Real Time PCR.

Findings: The results of MTT assay showed that Lactobacillus ramnose at a concentration of 10 µg/ml reduced the survival of HT-29 cells by 51.49±8.32%, and the coloring results detection showed that treatment of HT29 cells with Lactobacillus rhamnosis caused qualitative changes in cell apoptosis. Real-time PCR results showed that lactobacillus rhamnose bacteria significantly increased the expression of bax genes (4.2±0.22) and casp3 (6.88±0.92) compared to control gene in cancer cells of the HT29 colon ($P<0.05$).

Discussion & Conclusions: The results of this study showed that lactobacillus ramose bacteria increase the expression of bax, cas3 gene and cause induction of apoptosis in HT-29 cell line. Therefore, further studies can be used as an anti-cancer probiotic product in the treatment and prevention of colon cancer.

Keywords: Colon cancer, Gene expression, Lactobacillus rhamnose

1. Dept of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
**Corresponding author Email:dr_ahmadizadeh@yahoo.com*