

مطالعه تاثیر استوباکتر جداسازی شده از ترشيجات محلی در مسیر سیگنالینگ سلولی PTEN/AKT در سلول های سرطانی کولون HT29

پریا آذرنگ^۱، چنگیز احمدی زاده^{۲*}

(۱) گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران

(۲) گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۴

چکیده

مقدمه: برهم خوردن بالانس اکوسیستم میکروبی، باعث تغییرات بیولوژیکی در ارتباط با سرطان کولورکتال و تکثیر سلولی و مرگ برنامه ریزی شده آن ها و نیز پاسخ های ایمنی می گردد. هدف از این مطالعه تعیین تاثیر باکتری های پروبیوتیک بر بیان ژن های مرتبط با رشد، متاستاز و آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون HT29 می باشد.

مواد و روش ها: در طول این مطالعه ابتدا باکتری های پروبیوتیک استوباکتر کشت داده شدند و پس از تهیه کاندیشن مدیا بر روی سلول های سرطان HT29 تیمار شدند. با استفاده از روش MTT assay مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از سلول های تیمار شده انجام شد و تست DNA Ladder assay صورت گرفت. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA، بیان ژن های مرتبط با رشد (PTEN و AKT1) و نیز ژن مسیر آپوپتوز (BAX) به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان داد که باکتری های استوباکتر تکثیر سلول های HT-29 را مهار نموده و سبب القاء آپوپتوز در این سلول ها می شوند. نتایج DNA ladder assay حاصل از تیمار سلول های HT29 با باکتری های ذکر شده تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی را نشان داد. علاوه بر این نتایج Real-time PCR نشان داد که باکتری های استوباکتر سبب افزایش بیان ژن های (BAX، PTEN) در سلول های سرطانی کولون HT29 شد.

بحث و نتیجه گیری: استوباکتر مسیر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون HT29 را تحریک نموده و می توان در جهت استراتژی جدید درمانی و یا اجوانت تراپی برای تیمار سرطان کولون استفاده نمود.

واژه های کلیدی: سرطان کلورکتال، باکتری استوباکتر، HT29

* 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

پروبیوتیک ها از جمله لاکتو باسیل ها خاصیت ضد تکثیر سلول های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است (۴) آپوپتوز مرگ برنامه ریزی شده سلولی است که نقش کلیدی در تنظیم تعداد سلول ها دارد (۵) در بسیاری از سرطان ها، کاهش توانایی در پیش بردن آپوپتوز باعث تغییر در فرآیند تکثیر سلولی و به هم خوردن آن می شود. تنظیم در زنده مانی و مرگ سلول ها به وسیله مولکول های عمل کننده در فرآیند آپوپتوز می تواند نقش به سزایی در پیشگیری و درمان سرطان ها داشته باشد (۶). بنا بر این هدف از این پژوهش مطالعه تاثیر استوباکتر جداسازی شده از ترشیدجات محلی در مسیر سیگنالینگ سلولی PTEN/AKT در سلول های سرطانی کولون HT29 می باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری آب ترشی به مقدار ۱۰ سی سی داخل فالکن های استریل تهیه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر روی محیط کشت MRS آگار اسپری شده و در مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. تعدادی تک کلون از پلیت برداشته و در داخل ۱۰ سی سی محیط کشت MRS مایع کشت داده شدند. پس از رشد از نمونه های جداسازی شده با استفاده از گلیسرول ۲۵ درصد استوک گیری شده و برای شناسایی مولکولی به کار گرفته شدند (شکل شماره ۱).

انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز به منظور شناسایی باکتری: واکنش زنجیره ای پلی مرز برای شناسایی نمونه های جداسازی شده انجام شد. بعد از این که از کلیه نمونه ها DNA ها استخراج گردید PCR بر روی DNA ها به روشی که توضیح داده خواهد شد انجام گردید. ابتدا توالی پرایمرها توسط نرم افزار oligo5 انجام شد و برای سفارش به شرکت تکاپوزیست برای سنتز ارسال انجام شد. توالی پرایمر مربوط به شناسایی باکتری استوباکتر به صورت زیر می باشد: مستقیم

5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'

معکوس

5'-TACCTTGTTAGGACTTCACC-3'

روش کار با رده سلولی HT29: مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی علوم پزشکی تبریز،

سرطان کولورکتال از تجمع هر دوی تغییرات اکتسابی ژنتیکی و اپی ژنتیکی ناشی می شود که اپتلیوم غده ای نرمال رابه ادنوکارسینوم تهاجمی تبدیل می کند. در سراسر جهان، بیش از یک میلیون نفر هر سال مبتلا به سرطان کولورکتال بوده که میزان مرگ و میر بیماری های خاص نزدیک به ۳۳ درصد در کشورهای توسعه یافته است (۱). سرطان کولون از مهم ترین سرطان ها در سراسر دنیا محسوب می شود سرطان کولورکتال سومین سرطان تشخیص داده شده در بین مردان و زنان بوده که حدود ۷۵ درصد از بیماران فرم های پراکنده ای از این بیماری را داشته اند ۲۵ درصد باقی مانده از بیماران دارای سابقه فامیلی از بیماری بوده که بیان کننده ژن های مشترک و محیط می باشد اگر چه ۵- درصد از ۶ درصد سرطان کولورکتال منجر به جهش های وراثتی در ژن های بزرگ می شود باقی مانده فرم های خانوادگی از تداخل بین ژن های وراثتی و فاکتورها یا عامل های محیطی می باشد (۲). پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده و مفیدی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان و با اثر بر فلور میکروبی بدن، باعث بروز اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان می شوند. بیشتر پروبیوتیک ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری های اصلی فلور میکروبی روده انسان می باشند و در آن جا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند. بعضی از این میکروارگانیسم ها سویه های انتخابی باکتری های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند. Altonsy و همکاران القاء مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیز در سلول های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیوتیک های مثل *Lactobacillus rhamnosus*، *Bifidobacterium lactis*، را گزارش داده اند اما هنوز روشن نیست که آیا پروبیوتیک ها توانایی مشابه در تحت تاثیر قرار دادن آپوپتوز در سلول های کولون نرمال انسانی را دارند *Propionibacterium freudenreichii* مرگ سلولی را در رده های سلول های سرطانی معده و کولون انسانی، از طرق ترشح اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در محیط کشت القاء می کند (۳). یکی از مکانیسم های عملکردی

در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی HT29 از بانک سلولی پاستور تهیه و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شد. سلول ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی سی محیط کشت RPMI1640 (Gipco، آمریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ ماکروولیتز آنتی بیوتیک (پنی سیلین $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ و استرپتومایسین $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس سلول ها پاساژ داده شده و با شمارش سلول ها و با توجه به محاسبات مربوط به Seedind density مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی را توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانید و و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر توسط میکروسکوپ، در انکوباتور قرار گرفت (۷).

تست *Microculture Tetrazolium* (MTT)
Test: آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی، dimethylthiazol-2-yl)- 2, 5 --4, 5)-3 diphenyltetrazolium bromide به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی انجام می شود. در این روش برخلاف سایر روش ها مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول ها می شوند. حذف شده اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر در یک میکروپلیت انجام می شوند لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است ابتدا تعداد مناسبی از سلول های HT29 در هر یک از چاهک ها کشت داده می شوند (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) بعد از ۲۴ ساعت چاهک ها کنترل شده و مقدار مناسبی از باکتری ترموفیلوس زنده به چاهک ها افزوده می شود به چاهک ها ۴ نوع OD مختلف باکتری افزوده می شود ۰/۵، ۱، ۱/۵ و پلیت ها به مدت ۲، ۶ ساعت جهت تاثیر باکتری ها انکوبه می شوند. OD باکتری ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شده است میزان باکتری در OD1 برابر است با 8×10^9 سلول در هر

میلی لیتر است. این میزان برای OD2 برابر است با 1.6×10^9 سلول در هر میلی لیتر، برای OD1.5 برابر است با 1.2×10^9 سلول در هر میلی لیتر و برای OD.5 می شود 4×10^8 سلول در هر میلی لیتر. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT (۲ میلی گرم در میلی لیتر حل شده در PBS) جایگزین می شود. سلول تیمار نشده با باکتری به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (گالیسین 0.1 M ، NaCl 0.1 M ، دارای pH 10.5 بهینه شده با 1 M NaOH) جایگزین گردید. سپس پلیت ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شیک (shake) گردیدند. سرانجام تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. زیست پذیری سلولی نسبی به صورت $100 \times \frac{\text{نمونه ها } A570}{\text{کنترل } A570}$ محاسبه گردید. کل آزمایش به صورت سه تکرار انجام شد (۸).

رنگ آمیزی سلولی دی (Dapi staining):
 رنگ آمیزی (2-diamidino-6-phenylindole) روشی مناسب و سریع جهت تشخیص اجسام آپوتوتیک و به تبع آن تغییرات مورفولوژیک به شمار می رود. برای بررسی مستقیم اثرات استوباکتر بر سلول های HT29، طبق پروتکل رنگ آمیزی dapi انجام گردید. سلول ها پس از رنگ آمیزی با میکروسکوپ فلورسانت Olympus IX81 invert مجهز به Olympus DP70 camera (Olympus Corp., Tokyo, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA به منظور استخراج RNA، سلول ها توسط تریزول لیز شدند. به طور خلاصه، ابتدا سلول های تیمار شده با باکتری تحت تاثیر بافر تریزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به داخل میکروتیوب های DNase/RNase-free منتقل شدند و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس ۲۰۰

شدند. بدین منظور ابتدا ژل ۲ درصد ساخته شد و نمونه ها پس از بسته شدن ژل بر روی ژل لود شدند و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شدند.

سنتر $xDNA$ جهت اندازه گیری میزان تغییرات بیان ژن به روش Real-time PCR بایستی از نمونه DNA استفاده شود. بدین منظور می بایست از روی نمونه RNA استخراج شده cDNA سنتز شود. RNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس به cDNA تبدیل می شود. برای این منظور از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptas ساخت شرکت Thermo Fisher استفاده شد

تهیه پرایمر: پرایمر مورد استفاده توسط نرم افزار 5 oligo طراحی شد و سپس توسط وب سایت NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) شدند که اطلاعات آن ها در جدول شماره ۱ موجود است. تمام پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند.

میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰ درصد اضافه شد. سپس تیوب ها به مدت یک شبانه روز در دمایی ۷۰- نگهداری شده، در روز بعد تیوب ها را به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۱۲۰۰۰ rpm دور سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی را دور ریخته، رسوب را در دمای محیط خشک گردید. در انتها رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل گردید. مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop (Wilmington, DE, USA) اندازه گیری و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

الکتروفورز نمونه RNA های استخراج شده: به منظور بررسی کیفیت RNA های استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز، الکتروفورز

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

توالی پرایمر	نام پرایمر
5-GAT GCG TCC ACC AAG AAG -3'	Forward
5-AGT TGA AGT TGC CGT CAG-3'	Reverse
5-CATCACACCACCTGACCAAT-3'	Forward
5-CTCAAATGCACCCGAGAAAT-3'	Reverse
F:5-CGGTGGATCCCCTTTATTG-3'	Forward
R:5-CTAACCAGGAATCCGATG-3'	Revers
F:5-TGCAGAGGATGATTGCTGAC-3'	Forward
R:5-GATCAGCTCGGGCACTTAG-3'	Revers

بیان ژن GAPDH نرمالیزه شده است، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد

آنالیز آماری داده ها: در مورد نتایج به دست آمده برای میزان بیان ژن ها، ابتدا CT های به دست آمده برای هر ژن توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. سپس، میانگین نتایج به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد و سپس توزیع نرمال بودن نتایج توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. نتایجی که توزیع نرمال داشتند، توسط آزمون Paired Sample t-Test در دو گروه مقایسه شدند و نتایجی که توزیع نرمال نداشتند، توسط آزمون

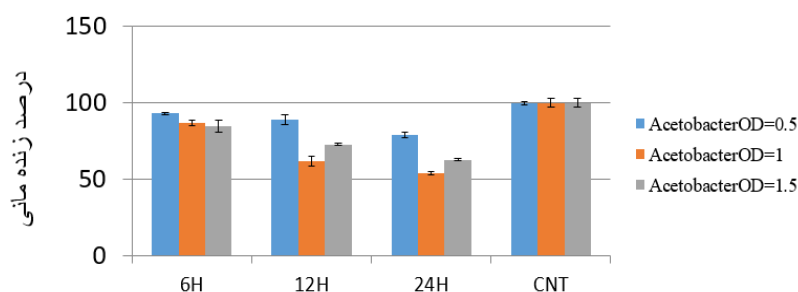
Real-time RT-PCR: دستگاهی که برای انجام Real time از آن استفاده شد (Corbett 6000) می باشد. محاسبه سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه انجام شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژن های PTEN, AKT, BAX و GAPDH با استفاده از مقدارهای CT محاسبه شد. بیان ژن نسبت به بیان ژن GAPDH اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط کالیبراتور داخلی (نمونه های کنترل هر آزمایش) استانداردسازی شدند. مقدار تغییر یافته بیان ژن PTEN, AKT و BAX در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل که به وسیله میزان

غیر پارامتری Mann Whitney با هم مقایسه شدند. این آزمون ها زمانی معنی دار در نظر گرفته شدند که مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بود.

یافته های پژوهش

کشندگی باکتری های استوباکتر بر روی رده سلولی HT29: به منظور بررسی اثر کشندگی باکتری های استوباکتر بر روی سلول های HT29، ابتدا تعداد سلول های مورد نیاز جهت آزمایش بهینه سازی شدند، سلول های مذکور به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس این سلول ها در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. سلول ها یک روز بعد

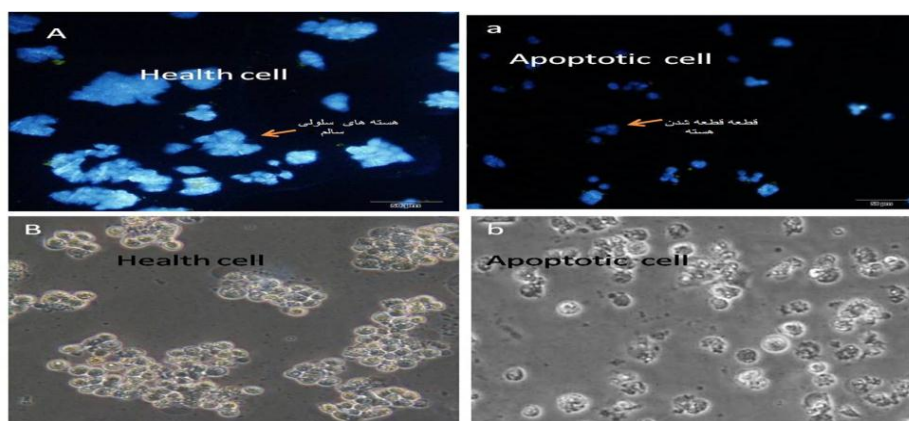
که به مقدار ۲۰ هزار عدد رسیدند یعنی زمانی که ۲ برابر گردیدند، با غلظت های افزایشی باکتری های کشت داده شده و سپس تهیه محیط کشت کاندیشن به مدت ۴ و ۱۲ ساعت تیمار شدند. برای هر غلظت باکتری ۳ تکرار در نظر گرفته شد و ۳ خانه به عنوان کنترل با محیط کاندیشن تیمار نگردیدند. بعد ۴ ساعت هیچ اثری دیده نشده اما بعد از ۱۲ ساعت تیمار سلول ها با محیط فیلتر شده کاندیشن استوباکتر به دست آمد. نتایج حاصل از MTT در شکل های زیر نشان داده شده اند (شماره ۱).



نمودار شماره ۱. اثر محیط کشت کاندیشن باکتری استوباکتر بر روی حیات سلولی پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون. سلول های HT29 تحت تاثیر غلظت های مختلف باکتری استوباکتر قرار گرفتند، شایان ذکر است طی مدت ۴ ساعت انکوبه شدن سلول های HT29 با باکتری های استوباکتر میزان IC50 مشخصی حاصل نگردید.

شماره ۱ سلول های رنگ شده و غیر رنگ شده توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت تصویر برداری شده است نشان داده است.

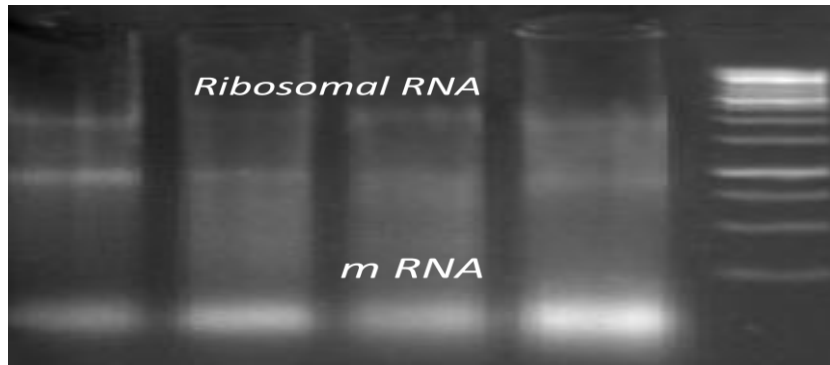
هم چنین طبق روش ذکر شده در فصل مواد و روش ها پس از تیمار سلول ها به منظور بررسی اپوپتوز سلول ها رنگ آمیزی dapi انجام شد شکل



شکل شماره ۱. رنگ آمیزی سلول های تیمار شده با رنگ dapi. همان طور که نشان داده شده است سلول های مورد تیمار در مقایسه با سلول های بدون تیمار با محیط کاندیشن باکتری وارد اپوپتوز شده و هسته های ریزتری را تشکیل داده اند. A: هسته سلول های سالم رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت. a: هسته سلول های اپوپتوز شده و رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت که هسته های قطعه قطعه شده دارند. B سلول های سالم بدون زیر میکروسکوپ نوری معمولی. b: سلول های اپوپتوز شده زیر میکروسکوپ نوری معمولی.

شرح داده شد استخراج گردیدند. سپس غلظت RNA نمونه ها با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد که نتایج نشان داد RNA های استخراج گردیده دارای کیفیت مطلوبی هستند(شکل شماره ۲).

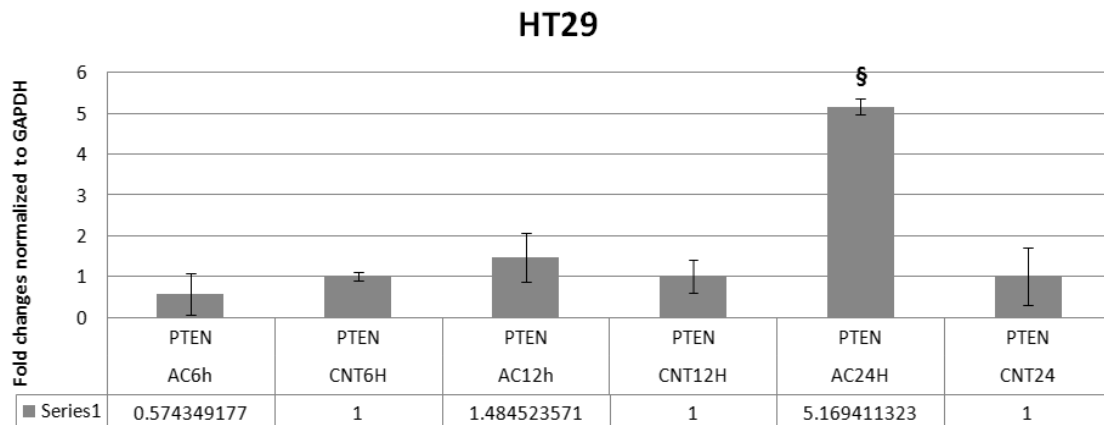
ارزیابی کیفی RNA استخراج شده: به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن ها، سلول های HT29 تحت تاثیر غلظت IC50 باکتری های استوباکتر که در آزمون MTT به دست آمده بود قرار گرفتند. سپس RNA این سلول ها به شیوه ای که در بخش مواد و روش ها



شکل شماره ۲. تصویر ژل الکتروفورز total RNA استخراج گردیده نمونه ها. جهت کنترل کیفیت RNA های استخراج شده، نمونه ها بر روی ژل الکتروفورز شدند

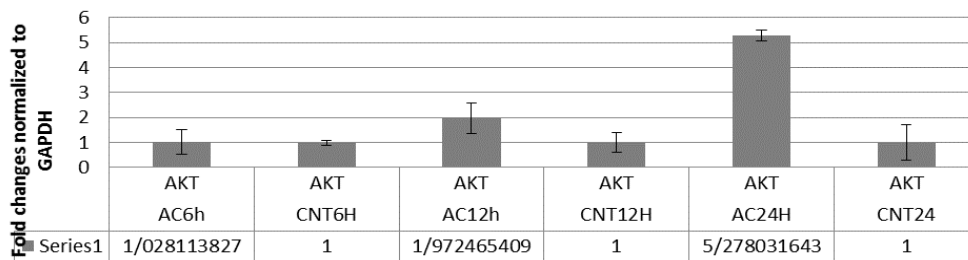
زمانی ۲۴ ساعت باعث افزایش میزان بیان ژن های PTEN و ACT می شود(نمودار شماره ۲، ۳، ۴).

نتایج تغییرات بیان ژن را در مورد ژن PTEN، ACT و bax نشان داد که باکتری استوباکتر در کشت هم جوار با سلول های سرطانی در بازه



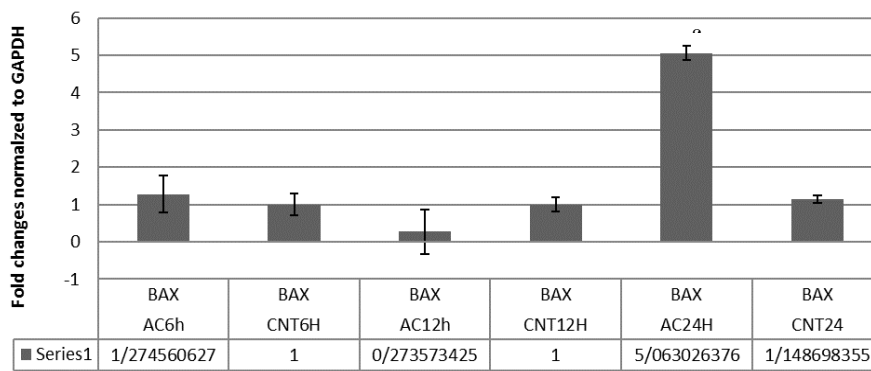
نمودار شماره ۲. میزان بیان ژن PTEN در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های استوباکتر سلول های HT29 با غلظت های IC50 باکتری های استوباکتر. به صورت تکی به مدت ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد و $P < 0.05$ معنی دار (§) در نظر گرفته شد.

HT29 cancer cell line



نمودار شماره ۳. میزان بیان AKT در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های استوباکتر. سلول های HT29 با غلظت های IC50 باکتری های استوباکتر. به صورت تکی به مدت ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد و $P < 0.05$ معنی دار (\$) در نظر گرفته شد.

HT29



نمودار شماره ۴. میزان بیان bax در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های استوباکتر. سلول های HT29 با غلظت های IC50 باکتری های استوباکتر. به صورت تکی به مدت ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد $P < 0.05$ معنی دار (\$) در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری

افزایش بروز سرطان کلورکتال در سه دهه گذشته در ایران آن را به عنوان معضل عمده سلامت عمومی شناسانده است. یک تعداد زیادی از مطالعات اپیدمیولوژی برای بررسی فرضیه های خاص در مورد فاکتورهای خطر سرطان کلورکتال به ویژه برای رژیم غذایی مثل رژیم غذایی غربی (انرژی و گوشت بالا، سبزی، میوه و فیبر دریافتی کم) که ممکن است در برهمکنش محیط و ژن نقش داشته باشند صورت پذیرفته است. حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد سرطان های کلورکتال اسپورادیک هستند و اعتقاد بر این است که تحت تاثیر رژیم غذایی، شیوه زندگی، فاکتورهایی محیطی و جهش های سوماتیک کسب شده شکل می گیرند (۹). معروف ترین گروه پروبیوتیک ها،

باکتری های اسید لاکتیک هستند. مطالعات نشان داده اند باکتری های لاکتیک اسید شروع و پیشرفت کارسینوماز در کولون را از طریق مسیرهای مختلف مهار می نمایند. مکانیسم های مولکولی و سلولی باکتری های لاکتیک اسید در جلوگیری از سرطان کلورکتال شامل موارد ذیل هستند. آپوپتوز یک فرمی مرگ سلولی برنامه ریزی شده از نظر ژنتیکی است و نقش کلیدی را در تنظیم تعداد سلول ها بازی می کند. یک رویداد پاتوژنتیک مهم در بسیاری از انواع سرطان ها کاهش توانایی در به راه انداختن آپوپتوز همراه با تغییر در فرآیندهای کنترلی تکثیر سلولی است. تنظیم بقا و مرگ سلولی در سطح مولکولی به وسیله فرآیند آپوپتوز یک پیشگیری دارویی و پتانسیل درمانی عظیمی به شمار می رود. چندین مطالعه نشان داده اند

را در موش های بیمار شده افزایش دادند(۱۴).
 Wagner و همکاران ایراد نمودند که باکتری های *Lactobacillus reuteri* (L. reuteri) ممکن است سرطان کلورکتال را از طریق کاهش بیان محصولات ژنی وابسته به فاکتور هسته ای $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (kappaB) پیشگیری نمایند. این محصولات ژنی در واقع تکثیر Cox-2 , cyclin D1 و بقاء Bcl-2 , Bcl-xL سلولی را تنظیم می نمایند(۱۵). Diehl علاوه بر این *L. reuteri* ها فعالیت $\text{NF-}\kappa\text{B}$ القاء شده توسط فاکتورهای نکروز توموری (TNF) از جمله بیان ژن گزارشگر وابسته به $\text{NF-}\kappa\text{B}$ را یک روال وابسته به زمان و دوز مهار می نمایند تا بدین صورت رشد سلول های سرطانی را کند نمایند(۱۶). Liu و همکاران در مطالعه ای آزمون های بالینی تاثیر پروبیوتیک ها در کاهش عوارض عفونی پس از جراحی را در بیماران سرطان کلورکتال نشان داده اند. به طور مشابهی، پیامدهای عملی و کیفیت در ارتباط با سلامتی طول عمر به طور چشمگیری در بیمارانی که تحت جراحی برشی سرطان کلورکتال در پی تیمار با *L. acidophilus* و *Bacillus natto* قرار گرفته بودند بهبود یافت(۱۷). اگر چه هیچ مطالعه بالینی وجود ندارد که باکتری های استوباکتر کاهش در عود سرطان کلورکتال را نشان داده باشند، برخی لاکتوباسیل ها به طور چشمگیری کاهش در عود دیگر سرطان ها مثل سرطان *superficial bladder* را نشان داده است. مطالعه حاضر نشان داد که استوباکتر جداسازی شده از ترشیدجات محلی که به عنوان یک غذای تخمیری به حساب می آید می تواند سرطان کلورکتال را با تاثیر بر سیگنالینگ سلولی تحت تاثیر قرار دهد. میزان بیان ژن PTEN در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های استوباکتر با غلظت های IC_{50} محیط کاندیشن باکتری های استوباکتر به مدت ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. همان طور که نتایج نشان داد باکتری استوباکتر توانسته بود میزان ژن PTEN را که یک پروتئین آنتی سرطان می باشد افزایش دهد. اما به موازات آن این باکتری در غلظت های مختلف باعث افزایش ژن AKT هم شده بود که یک پروتئین است باعث رشد سلول های سرطانی و بر عکس PTEN

که باکتری های اسید لاکتیک در تنظیم آپوپتوز سلولی از طریق مسیرهای داخلی و بیرونی که به طور بالقوه مکانیسم های حیاتی در جلوگیری سرطان کلورکتال هستند نقش ایفا می نمایند(۱۰). شواهد بسیار زیادی وجود دارد مبنی بر این که باکتری های پروبیوتیک می توانند در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز که به طور بالقوه مکانیسم هایی بسیار مهم در جلوگیری از سرطان کلورکتال به شمار می آیند نقشی داشته باشند. مطالعه دیگری توسط Darmoul و همکاران گزارش شده است. آن ها با استفاده از کشت رده سلولی سرطانی کولون انسانی HT29، اثر شیرهای تخمیری را بر روی رشد و تکثیر سلول های سرطانی کولون بررسی کردند و شیرها توسط یکی از گروه های باکتریایی *Bifidobacterium*, *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus* یا مخلوطی از باکتری های *Lactobacillus* و *Streptococcus thermophiles* *bulgaricus* تخمیر شدند. سپس سلول های HT-29 به شیرهای تخمیر شده اضافه شدند، مشخص شد تنها *L. acidophilus* هیچ گونه اثری را بر روی رشد و تمایز سلول سرطانی ندارد در حالی که ۳ نوع باکتری دیگر به طور چشمگیری میزان رشد سلول های HT-29 را کاهش دادند به طوری که منتج به کاهش ۱۰ تا ۵۰ درصدی در تعداد سلول های سرطانی در شرایط ثابت گردید و این کاهش در مورد این ۳ نوع باکتری متفاوت بود(۱۱). layer و همکاران دریافتند که *Lactobacillus reuteri* فعالیت $\text{NF-}\kappa\text{B}$ القاء شده توسط TNF را در یک دوز و وضعیت وابسته به زمان مهار می کند(۱۲). Singh و همکاران آشکار نمودند که یک تجویز روزانه کشت های خشک شده با انجماد سخت باکتری *B. longum* در موش ها منتج به مهار چشمگیر بروز تومورهای کولون و کثرت آن ها می شود و آن هم چنین اندازه تومور را هم کاهش می دهد(۱۳). چن و همکاران اثرات تجویز دهانی باکتری های *Lactobacillus acidophilus* را روی سرطان های کولورکتال موش ها تجزیه و تحلیل نمودند. نتایج دلالت بر آن داشت که *L. acidophilus* شدت کارسینوژنز کلورکتال را کاهش دادند و از طرفی مرگ برنامه ریزی شده سلولی

توسط آسوده فر و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شده است. آن ها لاکتوباسیل پلاتاروم را به عنوان باکتری پروبیوتیک بر روی سلول های سرطانی HT29 استفاده نمودند و مسیر PTEN را به عنوان مسیر آپوپتوز سلول های سرطانی معرفی نمودند (۱۹). نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که باکتری استوباکتری می تواند با تحریک بیان ژن PTEN سلول های سرطانی را مهار کند. هم چنین این باکتری با فعال کردن ژن *bax* توانست سلول های سرطانی HT29 را وادار به مرگ برنامه ریزی نماید. بنا بر این استفاده از این باکتری می تواند به عنوان مکمل دارویی برای بیماران سرطانی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از این باکتری ها نه تنها باعث جلوگیری از سرطان روده بلکه در درمان آن ها می تواند نقش مهمی داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب صمیمانه سپاسگزاری می شود. و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا را یاری کردند تقدیر و تشکر می - نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد خانم پریا آذرنگ با کد ۱۴۴۳۰۵۱۳۹۵۲۰۰۱، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب می باشد.

References

1. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance clinical guidelines and rationale update based on new evidence. *Gastro Enterol* 2003;124:544-60. doi: 10.1053/gast.2003.50044
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70. DOI.org/1001016/S0092-8674(00)81333-1
3. Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR, Teixeira MR, Lindgjaerde OC, Lothe RA. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta analysis of copy number changes. *Gen Chrom Cancer* 2006;45:31-41. doi: 10.1002/gcc.20261
4. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, et al. Probiotic

عمل می کند. پروتئین PTEN باعث دفسفریله شدن AKT می گردد به همین دلیل با توجه به عدم آزمایش میزان دفسفریلاسیون AKT نمی توان تاثیر ضد سرطانی این باکتری را از طریق مسیر سیگنالینگ یاد شده تعیین نمود به همین دلیل ژن پروآپوپتوز BAX نیز در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داد این باکتری توانایی کنترل و مرگ سلول های سرطان کولون را دارا می باشد. این نتایج با نتایج قبلی مبنی بر تاثیر ضد سرطانی برخی از باکتری های پروبیوتیک را تایید می کند. این نتیجه با مطالعه ای که توسط Darmoul و همکاران تاثیر شیرهای تخمیری را بر رده سلولی سرطانی کولون انسانی HT29، گزارش کرده اند (۱۷) هم خوانی دارد اگر چه آن ها مکانیسم آپوپتوز سلول های سرطانی را ذکر ننموده اند. هم چنین مطالعه حاضر با مطالعه دیگری که زنونو و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش نموده اند هم خوانی کامل دارد آن ها به جای باکتری استوباکتری که در این تحقیق مطالعه شده است باکتری *Leuconostoc mesenteroides* را برای از بین بردن سلول های سرطانی HT29 استفاده نمودند. آن ها سیگنالینگ PTEN را به عنوان مکانیسم آپوپتوز سلول های سرطانی توسط این باکتری گزارش نمودند (۱۸). هم چنین مطالعه دیگری که مطالعه حاضر را تایید می کند

- derived ferrichrome inhibits col on cancer progression via JNK mediated apoptosis. *Nat Com* 2016; 10: 12365-7. doi: 10.1038/ncomms12365
5. Elmore S. Apoptosis a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-9. doi: 10.1080/01926230701320337
 6. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Euro J Endocrin* 1998; 138: 482-91.
 7. Oliver MK, Harrison NE, Bishop JJ, Cole PJ, Laurent G. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 1989; 92, 513-8.
 8. Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozgar Z. [Cytotoxicity and antimicrobial assessment of Euphoria

- hebecarpa]. Iran J Pharm Res 2004; 3: 75-82. (Persian) doi.org/10.1016/s0378-4274(03)90322-5
9. Le K, Leu RL, Brown L, Hu YR. A Synbiotic combination of resistant starch and bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen damaged cells in Rat colon. J Nut 2005; 135: 996-1001. doi: 10.1093/jn/135.5.996
10. Hod K, Ringe Y. Probiotics in functional bowel disorders. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2016;30:89-97. doi: 10.1016/j.bpg.2016.01.003
11. Darmoul D, Lacasa M, Baricault L, Marguet D, Sapin C, Trotot P, et al. Dipeptidyl peptidase IV CD26 gene expression in enterocyte like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2 cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. J Biol Chem 1992;267:4824-33
12. Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF induced apoptosis in human myeloid leukemia derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. Cell Microbiol 2008;10:1442-52. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x
13. Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS. Bifidobacterium longum, a lactic acid producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis 1997;18:833-41. doi: 10.1093/carcin/18.4.833.
14. Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. Food Control 2009;20:598-602. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.08.019
15. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat Rev Cancer 2009;9:537-49. doi: 10.1038/nrc2694
16. Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. Clin Biochem 1999;32:571-8. doi: 10.1016/S0009-9120(99)00057-0
17. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, et al. Randomised clinical trial the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post operative infectious complications in colorectal cancer surgery a double blind study. Ali Pharmacol Ther 2011;33:50-63. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04492.x
18. Zununi VS, Barzegari A, Rahbar SY, Goreyshi A, Omidi Y. [Leuconostoc mesenteroides derived anticancer pharmaceuticals hinder inflammation and cell survival in colon cancer cells by modulating NF- κ B/AKT/PTEN/MAPK pathways]. Biomed Pharm 2017;94:1094. (Persian) doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.033
19. Asoudehfard A, Barzegari A, Dehnad A, Bastani S, Golchin A, Omidi Y. [Lactobacillus plantarum induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signaling pathways]. BioImpacts 2017;7:193-8. (Persian) doi: 10.15171/bi.2017.22.

◆ The Study of the Effects of Acetobacter Isolated from Local Pickles in PTEN/AKT Signaling Route in Colon Cancer Cells (HT29)

Azarang P¹, Ahmadizadeh C^{2*}

(Received: August 26, 2018

Accepted: January 20, 2019)

Abstract

Introduction: The imbalance of the microbial ecosystem causes biological changes associated with colorectal cancer and cell proliferation and their planned death, as well as the immune responses. The aim of this study was to determine the effect of probiotic bacteria on the expression of genes associated with growth, metastasis and apoptosis in cancer cells of the HT29 colon.

Materials & Methods: During this study, probiotic Acetobacter were cultured and treated with HT29 cancer cells after preparation of media. The MTT assay method was investigated. DNA extraction from the treated cells was performed and the DNA Ladder assay test was performed. After extraction of RNA and preparation of cDNA, the expression of genes related to growth (AKT1 and PTEN) and apoptosis pathway gene (BAX) was measured by Real-timePCR.

Findings: The results of the MTT assay showed that the Acetobacter bacteria inhibited the proliferation of HT-29 cells and induced apoptosis in these cells. The DNA ladder assay results from treatment of HT29 cells with these bacteria showed qualitative changes in cell apoptosis. In addition, the results of Real-time PCR indicated that the bacterial strains increased the expression of BAX (PTEN) genes in the cancer cells of the HT29 colon.

Discussion & Conclusions: Acetobacter stimulates cellular apoptosis signaling pathway in cancer cells of the HT29 colon and it can be used as an adjuvant therapy in colon cancer treatment or in new treatment strategies.

Keywords: Colorectal cancer, Acetobacter, HT29

1. Dept of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran

2. Dept of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

*Corresponding author Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com