

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^۱، چنگیز احمدی زاده^{۱*}

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶

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 casp3، bax، 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 $51/49 \pm 8/32$ درصد شد و نتایج رنگ آمیزی دیبی نشان داد تیمار سلول های HT29 با باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز باعث تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی می شود. نتایج Real time PCR نشان داد که باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز سبب افزایش معنی دار بیان ژن های bax ($4/0 \pm 2/22$) و casp3 ($6/0 \pm 88/12$) 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 cas3، bax 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 تکثیر 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، محیطی و رژیم غذایی (۴،۵). 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 معمول ترین میکروارگانیسم های پروبیوتیکی به دو گروه باکتری ها و قارچ ها تقسیم می شوند باکتری لاکتوباسیلوس 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 هموستازی 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 مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس در سلول های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیوتیک های مثل *Lactobacillus Bifidobacteriumlactis rhamnosus*، را گزارش نموده اند (۶). نتایج به دست آمده توسط Baldwin و همکاران نشان می دهد که *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* قادرند توان القایی آپوپتوزیس ۵-فلورووراسیل 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 تنظیمی مهم در برابر سرطانی شدن سلول ها است. سرطان در نتیجه تغییرات متعدد در چندین ژن مختلف به وقوع می پیوندد از جمله ژن های مهمی که در سرطان کولون درگیرند، *bax* و *caspase3* می باشد. آپوپتوز از دو طریق داخلی و خارجی سبب فعال شدن گروه خاصی از پروتئازهای وابسته به آپاراتات 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 شود با تغییر نسبی واسطه های پروآپوپتوتیک (مانند *bax*) نفوذپذیری غشای میتوکندری به سیتو کروم C افزایش یافته و با رهاسازی آنآپوپتوزوم شکل گرفته و سبب فعال شدن *casp* می شود (۸،۹). کاسپازها، پروتئازهای اختصاصی هستند و سوبسترای خود را از محل آپاراتات 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 آغازگر و اجرایی 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 آغازگر 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 مخرب و سرطان زا مثل

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 دیپی (*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 ماکرولیتتر محلول نفوذپذیرکننده تریتونیکس 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 ماکرولیتتر رنگ (*DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)* اضافه شد. سلول ها با میکروسکوپ فلورسانت Olympus IX81 invert مجهز به Olympus DP70 (Corp), camera (Olympus) مورد ارزیابی قرار گرفتند در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الیزا (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 کشتدگی) 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 نشده با استفاده 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.

سنتر $xDNA$ ۱ میکروگرم از total RNA که با ۰/۲ ماکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ ماکرولیتتر 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 (x) buffer for MMLV RT، یک یونیت بر

اسیدهای صفراوی ثانویه و مواد موتازنی که توسط باکتری های روده ایجاد می شوند، می توانند در جلوگیری از سرطان 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 مطالعه تجربی آزمایشگاهی 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 (۱.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ پنی سیلین - ۱.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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 کشتدگی عصاره سلولی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز روی رده سلولی HT29 از روش رنگ سنجی MTT Sigma (Aldrich، آلمان) استفاده شد (۱۵).

غلظت های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 CO_2 ۵ درصد و

مشمول بر ۱۰ لاندا از محلول اصلی (Master Mix، ۰/۴ لاندا از پرایمر Forward، ۰/۴ لاندا از پرایمر Reverse، ۵ لاندا از DN متابی سولفیت شده و ۴/۲ لاندا آب مقطر می باشد. پس از اعمال تغییرات برای اندازه گیری میزان متیلاسیون ژنی از دستگاه Eco Biosystems شرکت استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوطه با استفاده از نرم افزار oligo 5 طراحی شده و توسط شرکت بایونیر (Bioneer، آلمان) سنتز گردید و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای ژن های cas و bax در این مطالعه به ترتیب زیر می باشد:

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

Real time RT-PCR واکنشش

PCR به صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب های 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).

ماکرولیتر مهارگر RNase را افزوده و در واقع در انتها حجم کلی هر تیوب 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 ماکرولیتر از DNA دچار تغییر متابی سولفیت شده تهیه شد. غلظت ۱/۲۰ به عنوان الگو برای Real time PCR استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت، واکنش تکثیر در حجم ۲۰ ماکرولیتر انجام شد که

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

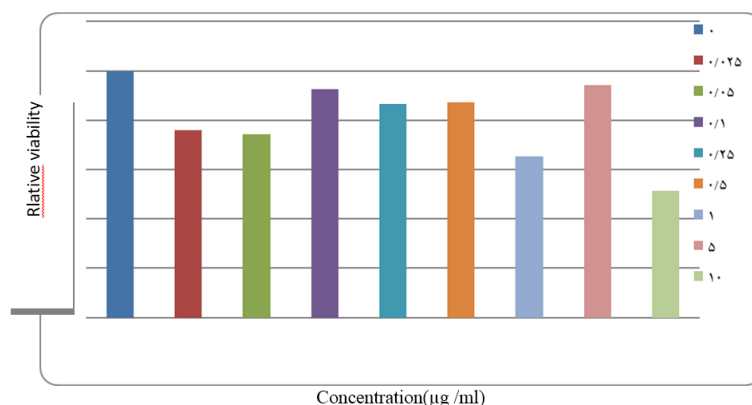
فعال سازی آنزیم (Hot start) در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. دناتوراسیون اولیه و Holding در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، انجام شد. طویل سازی در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۲۵ ثانیه صورت گرفت. جذب نور نیز در این دما صورت گرفت. بعد از این 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. رنگ Eva green (Fermentas, France) بعد از انجام واکنش های Real time PCR، 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 پلاروید عکسبرداری انجام گرفت

کاهش بقای زیستی سلول ها را به ترتیب $1.0 \pm 0.5/7$ ،
 $0.92/2 \pm 0.70/46$ ، $0.74/5 \pm 0.43/0.9$ ، $0.75/3 \pm 0.84/0.1$
 $0.65/1 \pm 0.46/5$ ، $0.78/6 \pm 0.18/12$ ، $0.86/3 \pm 0.48/44$
 HT29 سلول های $0.94/12 \pm 0.32/6$ ، $0.51/8 \pm 0.49/3$ شد. سلول های
 تحت تاثیر غلظت های مختلف باکتری لاکتوباسیلوس
 رامنوز قرار گرفتند.

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

یافته های پژوهش

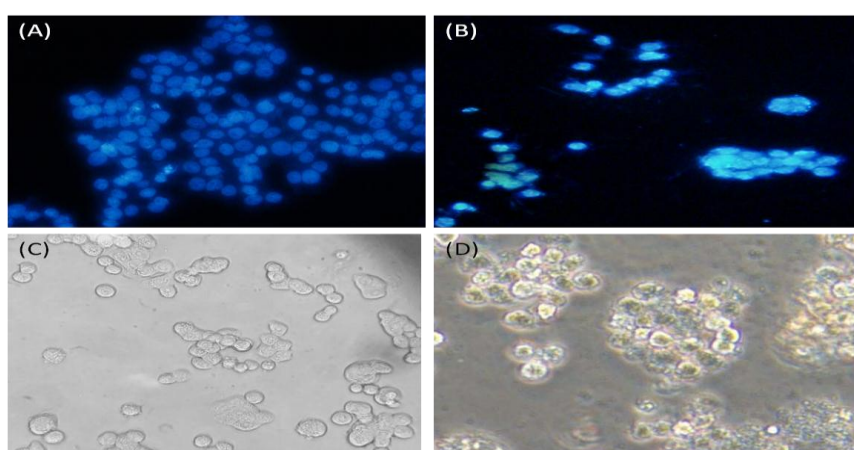
تیمار سلول های HT29 با غلظت های مختلف
 $0.25/0.1$ ، $0.05/0.1$ ، $0.25/0.1$ ، $0.5/0.1$ ، $1/0.1$ ، $5/0.1$ ، $10/0.1$ میکروگرم
 بر میلی لیتر با استفاده از تست MTT طی ۲۴ ساعت



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

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.

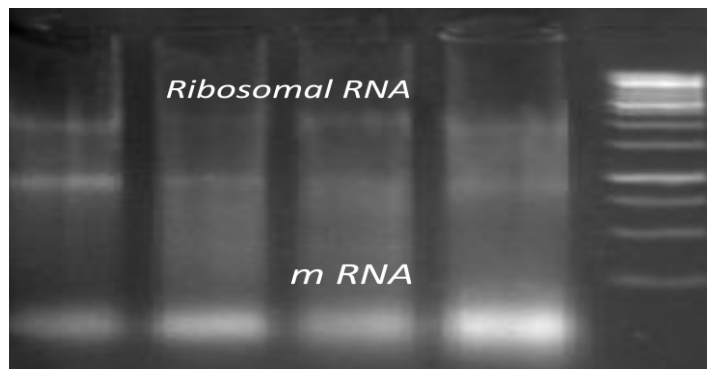
هم چنین نتایج نشان می دهد که عصاره سلولی
 لاکتوباسیلوس رامنوز در غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ بیشترین
 مهار سلولی را داشته اند که از لحاظ آماری معنی دار
 می باشد ($P < 0.05$). هم چنین طبق روش ذکر شده در
 فصل مواد و روش ها پس از تیمار سلول ها به منظور



شکل شماره ۱. رنگ آمیزی سلول های تیمار شده با رنگ dapi. تصویر میکروسکوپی سلول های HT29. تصویر میکروسکوپی 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

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.

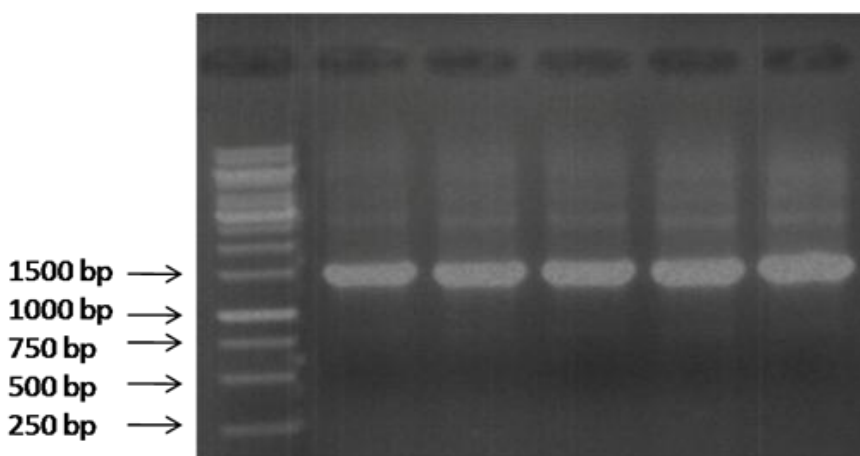
ارزیابی کیفی RNA استخراج شده، به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن ها، سلول های HT29 تحت تاثیر غلظت IC50 باکتری های لاکتوباسیلوس رامنوز در آزمون MTT به دست آمده بود قرار گرفتند. سپس



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.

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 می باشد.

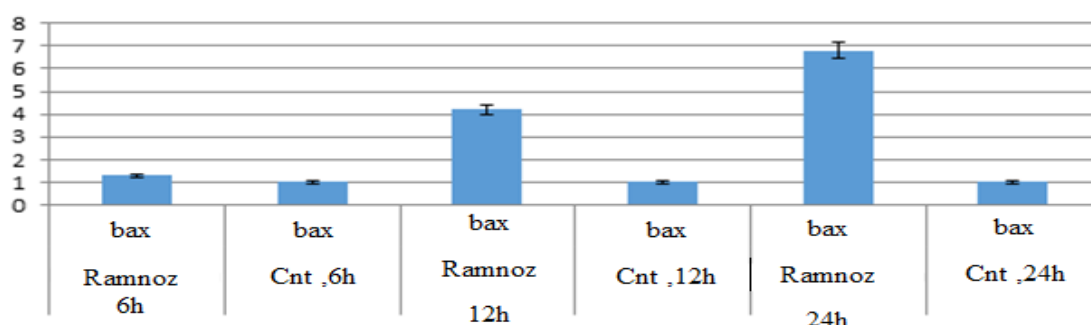
انجام واکنش زنجیره ای PCR برای ژن *16Srdna*: انتظار بر آن است که پس از انجام PCR قطعه تکثیری برای ژن ۱۵۰۰ جفت باز آورده شده



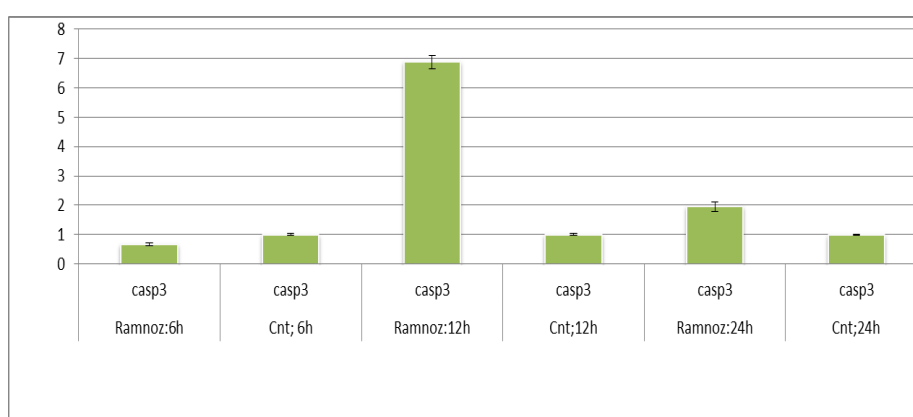
شکل شماره ۳. الکتروفورز آگارز ۱ درصد ژن *16S rdna* باکتری های لاکتوباسیل رامنوز جداسازی شده از نمونه مدفوع لدر مورد استفاده kb ۱ شرکت ترموفیشر می باشد.

۰/۰±۶۶/۰۵۱، *cas3* و ژن ۶/۰±۸/۱۵، ۴/۰±۲/۲۲، ۶/۰±۸۸/۱۲، ۱/۰±۹۵/۱۷ که ژن *bax* در ۲۴ ساعت و ژن *cas3* در ۱۲ ساعت بیشترین افزایش بیان را دارند (اعداد به دست آمده میانگین ۳ بار تکرار می باشند).

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،



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 casp3 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 آپاپتوزی 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. Altosy و همکاران السقاء مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیز در سلول های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیوتیک های Lactobacillus

Bifidobacteriumlactis rhamnosus

commensalbacteria-Escherichiacoli. و Atopobiumminutum را گزارش داده اند(۶). در مطالعه دیگری گزارش شده است که EPS(exopolysaccharides) پروبیوتیک Lactobacillus Acidophilus در مرگ سلول های 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- κ B و کاهش پروتئین هایی که تکثیر سلولی (cyclin D1 and COX-2) یا مهار 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 *Lactobacillus casei/rhamnosus* 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 دیگری است که توسط پروبیوتیک 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 باکتری های (*Lactobacillus acidophilus*) را روی کنسرهای کولورکتال *L.acidophiles* موش ها تجزیه و تحلیل نمودند. نتایج نشان دلالت بر آن داشت که *L.acidophiles* شدت کارسینوژنز کولورکتال 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 کارسینوما 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 پیشگیرانه 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 مشابه 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 میتوکندری 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 سلولی 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 Microbes* 2015; 6: 209-17. doi.10.3920/BM2014.0067.
3. Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus probiotics 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 Ther* 2004; 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 Microbiol* 2010; 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-fluorouracil-induced apoptosis. *Nut Cancer* 2010; 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 Care* 2008; 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. Artificial death switches induction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. *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 Ther* 2001; 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 Bio* 2013; 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 Biotechnol* 2016; 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]. *Feyz* 2019; 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 Microbiol* 2008; 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 casei* soluble factors *Clin Nutr*. 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, Denariatz 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 Cont* 2009; 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 Cancer* 2010 5; 62:371-8. doi.10.1080/01635580903407197.
28. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Dis* 2017; 16:273. doi.10.1038/nrd.2016.253
29. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability. *J Gen Nut* 2011; 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 A¹, 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 rhamnose 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 rhamnosus 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 ramosae 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