Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Cytotoxicity Effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic Cell Extract and supernatants on Adenocarcinoma Gastric Cancer Cell Line and Analysis of some Apoptosis Genes Expression

Hanieh Hemmatian [1], Ali Sharifzadeh [2*], Faranak Aali [3]

[1] Dept of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Jan. 28, 2023
Received in revised form: May. 27, 2024
Accepted: Jun. 16, 2024
Published Online: Dec. 05,2024

**** Correspondence to:***
Ali Sharifzadeh
Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email:
al.sharifzadeh@iau.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Cancer is considered one of the most significant causes of death worldwide. Probiotics are living microbes that play a significant role in protecting the host in various ways. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of *Bifidobacterium bifidum* cell extract and supernatants as probiotic bacteria on the Adenocarcinoma gastric cancer cell line and analysis of *Fas*, *P53*, and *Bcl2* gene expression.

Materials & Methods: In this experimental study, the cell extract of heat-killed and supernatants *Bifidobacterium bifidum* was prepared. The cytotoxicity of cell extract and supernatants on AGS cell lines was evaluated in 24, 48, and 72 hours using a cytotoxicity assay. Moreover, the *P53*, *Bcl2*, and *Fas* apoptosis gene expression levels in the Adenocarcinoma gastric cancer cell line were analyzed using a molecular assay. The collected data were statistically analyzed using one-way ANOVA analysis with the Graph Pad Prism V.8 at the level of significance less than 0.05.

Results: Supernatant (pH = 6), then supernatant (pH = 4), and then cell extracts of *Bifidobacterium bifidum* were able to reduce the survival rate of the AGS cell line in 48 and 72 hours. The results of gene expression by molecular method also showed an increase in Fas and *P53* gene expression ($p < 0.05$) and a decrease in *Bcl2* gene expression ($p < 0.05$) in the adenocarcinoma gastric cancer cell line compared to the reference GAPDH gene expression after 72 hours.

Conclusion: Supernatant of *Bifidobacterium bifidum* with, respectively, pH = 6 and pH = 4, could induce apoptosis in the Adenocarcinoma gastric cancer cell line. So, it seems that *Bifidobacterium bifidum* has potential uses as a probiotic for pharmaceutical applications, including the prevention of gastric cancer.

Keywords: Gastric Cancer, Apoptosis, Probiotic

How to cite this paper: Hemmatian H, Sharifzadeh A, Aali F. Cytotoxicity Effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic Cell Extract and supernatants on Adenocarcinoma Gastric Cancer Cell Line and Analysis of some Apoptosis Genes Expression. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(5):92-105.

Introduction

Cancer is a major global cause of death, with gastric cancer being the third most lethal (1). Risk factors include Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, high salt intake, smoking, obesity, and family history (1). Treatments include surgery, chemotherapy, and radiotherapy, but patients may experience irreversible complications (2). Probiotics, living microbes, play a crucial role in protecting the host and have gained popularity for health promotion (3). Studies show that probiotics can improve the immune system. *Bifidobacterium bifidum*, a Gram-positive anaerobe found in the mouth, ileum, colon, vagina, and cervix, contributes to gut homeostasis through immune system modulation, pathogen elimination, antimicrobial activities, metabolite production, and intestinal epithelial barrier regulation (4,6). The specifics of *Bifidobacterium bifidum*'s beneficial role in generating anticancer properties stem from their ability to produce short-chain fatty acids (SCFAs), which hinder the growth and maturation of cancer cells (5,7). This mass-produced SCFA, namely butyrate,

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

propionate, and acetate, also aids in alleviating inflammation, a major risk factor in the development of cancer. The exploration of using *Bifidobacterium bifidum* as a therapeutic agent for cancer treatment holds a promising way ahead (3,7). Some studies indicated the efficacy and enhancement of cancer immunotherapy due to the potential of *Bifidobacterium bifidum* to generate antitumor responses (5,8). The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of *Bifidobacterium bifidum* cell extract and supernatants as probiotic bacteria on the Adenocarcinoma gastric cancer cell line and analysis of Fas, *P53*, and *Bcl2* gene expression.

Methods

The standard probiotic microbial strain *Bifidobacterium bifidum* was cultured in an anaerobic medium containing gas. The anaerobic medium was incubated at 37°C for 24 hours and then standardized to half McFarland concentration (OD = 0.08–0.13). The probiotic culture medium *Bifidobacterium bifidum* was centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was passed through a 0.22-micron filter. The resulting supernatant was divided into two separate parts. The initial supernatant had an acidic pH of 4 and the pH of the second supernatant was adjusted to neutral (pH = 6) by adding one normal sodium hydroxide (NaOH). To prepare the probiotic extract of *Bifidobacterium bifidum*, the test tube containing the bacteria was centrifuged at 5000 rpm after being removed from the incubator, and after discarding the supernatant, the sediment was washed three times with PBS. The human gastric adenocarcinoma cancer cell line was obtained from the cell bank of the Pasteur Institute of Iran, which was cultured in cell culture flasks and placed in an incubator with 95% humidity and 5% carbon dioxide at 37°C. Ten microliters of cell suspension and ten microliters of trypan blue were put on a neobar slide, and the number of living cells was counted. The plates were then put in an incubator for 20 minutes. During this time, the formazan crystals dissolved. After that, the tube was vortexed for 5 seconds and kept at room temperature for 5 minutes. 200 µl of chloroform was added to the tubes and gently inverted. The tubes were placed at -20°C for 20 minutes and then centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes at 4°C, and the supernatant was discarded. RNA extracted from control and treated cells was loaded onto an agarose gel, and the quality of the extracted RNA was measured by NanoDrop (Thermo Scientific, USA) at 260 nm. Finally, one unit of DNase enzyme was added per microgram of sample to remove (genomic) DNA and heated for 10 minutes at 65°C. In order to examine the expression level of Fas, *P53*, and Bcl-2 genes, a pair of forward and reverse primers designed for real-time PCR were used in the AGS cell line. The GAPDH gene was also used as an internal reference gene. For this purpose, 0.5 µl of each primer pair, 5 µl of Master Cyber, 1 µl of synthesized cDNA, and 3 µl of water for injection were added to each micro tube, and the heating program was set. The collected data were statistically analyzed using one-way ANOVA analysis with the Graph Pad Prism V.8 at the level of significance less than 0.05.

Results

Supernatant (pH = 6), then supernatant (pH = 4), and then cell extracts of *Bifidobacterium bifidum* were able to reduce the survival rate of the AGS cell line in 48 and 72 hours. The results of gene expression by molecular method also showed an increase in Fas and *P53* gene expression ($p < 0.001$) and a decrease in *Bcl2* gene expression ($p < 0.001$) in the adenocarcinoma gastric cancer cell line compared to the reference GAPDH gene expression after 72 hours.

Conclusion

The supernatant of *Bifidobacterium bifidum* with, respectively, pH = 6 and pH = 4, could induce apoptosis in the Adenocarcinoma gastric cancer cell line. So, it seems that *Bifidobacterium bifidum* has potential uses as a probiotic for pharmaceutical applications, including the prevention of gastric cancer.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing– Original Draft Preparation, Writing– Review & Editing, Visualization, Project Administration: HH, Formal Analysis, Resources. Data Curation: FA, Validation, Supervision: AS.

Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Islamic Azad University of Shahre Kord (IR.IAU.SHK.REC.1401.120). The authors avoided data fabrication,

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

No funding.

Acknowledgment

This research is the result of a dissertation in Microbiology, which was conducted at the Islamic Azad University of Shahre Kord. The authors of the article are extremely grateful from all of the people who cooperated in this research.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

اثر عصارهٔ سلولی و سوپرناتانت پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر مرگ ردهٔ سلول‌های سرطانی معده و بیان برخی از ژن‌های آپوپتوزی

هانیه همتیان [۱]، علی شریف‌زاده [۲*]، فرانک عالی [۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۳] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

نویسنده مسئول:
علی شریف‌زاده
گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email:
al.sharifzadeh@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان شناخته می‌شود. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با روش‌های گوناگون، نقش مهمی در حفاظت از میزبان در موارد مختلف ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی آثار سمیت سلولی عصاره و سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر روی ردهٔ سلول سرطانی معده و تجزیه‌وتحلیل بیان ژن‌های آپوپتوزی *P53*، *Bcl2* و Fas بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی، ابتدا عصارهٔ سلولی کشته‌شده با حرارت و سوپرناتانت باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* تهیه شد. در ادامه، آثار سمیت سلولی عصارهٔ سلول باکتری و سوپرناتانت آن روی ردهٔ سلول سرطانی معده در مدت‌زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی گردید. میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *P53*، *Bcl2* و Fasدر ردهٔ سلول‌های سرطانی معده نیز با استفاده از روش مولکولی بررسی شد. درنهایت، با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism vol.8 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه، داده‌ها تجزیه‌وتحلیل گردیدند (P<۰.۰۵).

یافته‌های پژوهش: نتایج آزمون سمیت سلولی نشان داد که سوپرناتانت با pH=6، سپس سوپرناتانت با pH=4و سپس عصاره باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، باعث کاهش بقای ردهٔ سلولی سرطان معده شد. نتایج میزان بیان ژن به روش مولکولی نیز حاکی از افزایش میزان بیان ژن‌های Fas و (0.05>P) *P53* و کاهش بیان ژن *Bcl2* (0.05>P) در مقایسه با بیان ژن مرجع GAPDH طی ۷۲ ساعت بود.

بحث و نتیجه‌گیری: سوپرناتانت‌های باکتری پروبیوتیک بیفید و باکتریوم بیفیدوم به‌ترتیب با pH=6 و pH=4 می‌توانند سبب القای آپوپتوز در ردهٔ سلول‌های سرطانی معده شوند و بنابراین، می‌توان با انجام مطالعات بیشتر از این باکتری به‌عنوان یک محصول پروبیوتیک ضدسرطان در پیشگیری از سرطان معده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، آپوپتوز، پروبیوتیک

استناد: همتیان هانیه، شریف‌زاده علی، عالی فرانک. اثر عصارهٔ سلولی و سوپرناتانت پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر مرگ ردهٔ سلول‌های سرطانی معده و بیان برخی از ژن‌های آپوپتوزی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، آذر ۱۴۰۳؛ (۵)۳۲: ۱۰۵-۹۲.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

پنجاه درصد سرطان‌های شایع در کشور مربوط به دستگاه گوارش است و در این میان، سرطان معده از همه شایع‌تر است (۱). سرطان معده یکی از مشکلات شایع در سرتاسر جهان است. علی‌رغم کاهش بروز سرطان معده در پنج دهۀ گذشته، این سرطان سومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان محسوب می‌شود (۲). عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی در روند سرطان معده ایفای نقش می‌کنند. علاوه بر این عوامل، تفاوت در سبک زندگی به‌ویژه عادات غذایی مانند مصرف نمک و غذاهای آماده نیز از علل زمینه‌ساز به‌شمار می‌آیند. میزان مرگ‌ومیر ناشی از سرطان معده به‌ویژه در تشخیص دیرهنگام بیماری در مرحلۀ پیشرفته، افزایش می‌یابد (۳). به علت نبودِ علائم بالینی ابتلا به سرطان معده، این بیماری در اغلب موارد در مرحلۀ پیشرفتۀ بیماری تشخیص داده می‌شود. درمان‌های استاندارد رایج برای سرطان معده شامل جراحی و شیمی‌درمانی است (۴). عمل جراحی راهکار مناسبی برای درمان است؛ اما خارج کردن تومورها در مواردی که مرزهای تومور کاملاً مشخص نیست و احیاناً تومور به بافت‌های دیگر متاستاز کرده است، معمولاً بیمار را در خطر بازگشت بیماری قرار می‌دهد (۵). همچنین مهم‌ترین عامل موفقیت‌آمیز نبودن جراحی غدد سرطانی نیز وقوع مجدد سرطان معده یا وقوع متاستاز به غدد لنفاوی در تقریباً پنجاه درصد موارد پس از یک جراحی موفق است (۶). شیمی‌درمانی نیز به‌ویژه پس از خارج کردن تومورهای معده، تأثیر مثبتی بر درمان بیماران خواهد داشت (۷)؛ همچنین در برخی مطالعات مشخص‌شده است که شیمی‌درمانی و رادیو درمانی همزمان هم می‌تواند حدود ۳۰ درصد درمان بیماران را افزایش دهد (۸). مهم‌ترین عامل موفقیت‌آمیز نبودن شیمی‌درمانی سرطان معده کارایی نسبتاً کم به همراه سمیت قابل‌توجه و مقاومت دارویی است (۹)؛ بنابراین، جستجوی راهبردهای درمانی مناسب برای درمان سرطان معده ضروری به‌نظر می‌رسد. باکتری‌ها به روش‌های مختلف در درمان سرطان به‌کار می‌روند که کاربرد آن به‌صورت آثار مستقیم ضدتوموری و یا انتقال پلاسمیدهای داخل سلولی دارای این آثار است. توکسین‌های باکتریایی نیز از طریق کشتن سلول‌ها و تغییر فرایندهای سلولی کنترل‌کنندۀ تکثیر، آپوپتوز و تمایز که با سرطان در ارتباط است، عمل می‌کنند (۱۰). داده‌های علمی اخیر از نقش مهم پروبیوتیک‌ها به‌عنوان بخشی از یک رژیم غذایی سالم برای انسان به‌منظور جلوگیری از عفونت‌های میکروبی به‌شدت حمایت می‌نمایند (۱۱). باور موجود بر این پایه قرار دارد که پروبیوتیک‌ها با تثبیت فلور میکروبی روده نقش محافظت‌کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهند. (۱۲). مصرف پروبیوتیک‌ها همچنین موجب تحریک سلول‌های ایمنی، کاهش التهاب، مهار تشکیل سلول‌های سرطانی و نیز کاهش عملکرد مواد ایجادکنندۀ سرطان روده در انسان می‌شود. مصرف پروبیوتیک‌ها حتی در طیف متفاوتی از محصولات تخمیری نیز می‌تواند آثار مثبتی را ایجاد کند. در موش نیز، مصرف پروبیوتیک‌ها تولید آنزیم‌های محافظت‌کننده مانند گلوتاتیون ترانسفراز را افزایش می‌دهد (۱۳). کاهش بار عوامل سمی در روده و افزایش تولید عواملی مانند بوتیرات که ترکیبات سمی را غیرفعال می‌نمایند، نیز از عوامل محافظتی است که باعث کاهش خطر سرطان می‌گردند (۱۴)؛ همچنین دیوارۀ سلولی برخی از باکتری‌های پروبیوتیک هم با مواد موتاژن ترکیب می‌شود و شدت سرطان‌زایی آن‌ها را کاهش می‌دهد. به‌طور طبیعی برخی مواد ازجمله آنزیم‌های بتاگلیکوزیداز، گلوکورونیداز، آزوردوکتاز و نیتروردوکتاز مواد پیش‌سرطان‌زا را به سرطان‌زاهای فعال تبدیل می‌کنند (۱۵). علی‌رغم آنکه در برخی گزارش‌ها نتایج بهتری از *لاکتوباسیل‌ها* نسبت به *بیفیدوباکتریوم‌ها* در سرطان روده مشاهده شده است؛ اما *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نیز از باکتری‌های گرم مثبت و ساکن طبیعی رودۀ بزرگ است که در ۸۰ درصد از کودکان و ۲۰ درصد از بزرگ‌سالان فلور غالب روده را تشکیل می‌دهد، به‌ویژه چند روز پس از تولد، از رودۀ نوزادانی که با شیر مادر تغذیه می‌شوند، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* قابل جداسازی است. جمعیت این باکتری در رودۀ بزرگ تا سنین بالا نسبتاً پایدار به‌نظر می‌رسد. گونه‌های مختلف *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به‌عنوان عوامل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

مقاومت در برابر کلونیزه شدن باکتری‌های بیماری‌زا در رودهٔ بزرگ شناخته شده‌اند (۱۷، ۱۶). سویه‌های مختلف *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* قادر به مهار رشد اشرشیا کولی O157:H7 مولد شیگاتوکسین در شرایط آزمایشگاهی هستند و با توجه به آثار پروبیوتیکی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، استفاده از آن‌ها در فراورده‌های لبنی به‌ویژه ماست متداول شده است (۱۸). بعضی از گونه‌های بیفیدوباکتریا می‌توانند به‌عنوان تولیدکنندگان مناسب فولات در محیط معده عمل کنند. بیوسنتز فولات تحت تأثیر pH، کربوهیدرات و عوامل خارجی قرار می‌گیرد (۱۹). *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس نیز در افزایش لنفوسیت‌های T در دستگاه گردش خون و افزایش فعالیت سیتوتوکسیسیته NK نقش دارد؛ همچنین به‌صورت آزمایشگاهی مشاهده‌شده است، جنس *بیفیدو باکتریا* به میزان فراوانی تشکیل ایمونوگلبولین A را تحریک می‌کند (۲۰). در بیماران با سرطان و التهاب رودهٔ بزرگ، تغییر فلور میکروبی روده ازجمله کاهش تعداد *بیفیدوباکتریوم* ها مشاهده گردیده است. این باکتری‌ها ساکارولیتیک هستند و اسیدهای استیک و لاکتیک را بدون ایجاد دی‌اکسید کربن تولید می‌کنند (۲۱). در بعضی از تحقیقات، *بیفیدوباکتریوم*ها برای پیشگیری و درمان وسیع‌الطیف گاستروآنتریت و سرطان بررسی شده‌اند؛ ازجمله استفاده از *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* که در نمونهٔ حیوانی نیز اثر مهارکنندگی در برابر عوامل موتاژن دارد (۲۲). هدف از این مطالعه بررسی آثار سمیت سلولی عصاره و سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* روی ردهٔ سلولی سرطان معده و ارزیابی برخی ژن‌های آپوپتوزی بود. گفتنی است، این تحقیق با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1401.120 در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به تصویب رسیده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی:

سوش میکروبی استاندارد پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC 1644 از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه و در محیط کشت MRS broth (Man–Rogosa–Sharpe broth) در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک کشت داده شد. جار بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس با غلظت نیم مک‌فارلند (OD=0.08-0.13) استاندارد گردید. محیط کشت پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در rpm۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی (supernatant) از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. سوپرناتانت حاصله به دو قسمت مجزا تقسیم گردید. سوپرناتانت اولیه pH اسیدی (pH=4) داشت و pH سوپرناتانت دوم با افزودن سود (NaOH) یک نرمال، خنثی (pH=6) می‌شد. برای تهیهٔ عصارهٔ پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نیز، لولهٔ آزمایش حاوی باکتری پس از خارج کردن از انکوباتور در ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب سه مرتبه با PBS شسته شد و درنهایت، رسوب شسته‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. گفتنی است، برای اطمینان از غیرفعال شدن باکتری‌ها، مجدداً کشت صورت می‌گرفت.

کشت ردهٔ سلول سرطانی ادنوکارسینوم معده:

ردهٔ سلول سرطانی ادنوکارسینوم معدهٔ انسان از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از افزودن ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد Pen strep و ۲ درصد گلوتامین به محیط کشت RPMI-1640 از شرکت Gibco، در فلاسک‌های کشت سلولی کشت داده شد و در انکوباتور با ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت تعویض می‌گردید (۱۷).

سنجش سمیت سلولی:

در ابتدا، محیط کشت از سطح سلول‌ها در مرحلهٔ قبل برداشته شد و به‌منظور جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، یک میلی‌لیتر تریپسین و پس از حدود ۲ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه و این سوسپانسیون سلولی در ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ می‌گردید؛ سپس مایع بالای رسوب جدا می‌شد و به رسوب ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه می‌گردید و در مرحلهٔ بعد، سلول‌های جداشده شمرده می‌شد. برای این کار،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی و ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو روی لام نئوبار ریخته و تعداد سلول‌های زنده شمارش می‌گردید؛ سپس به ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر عصارهٔ پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه، تعداد ۱۰.۰۰۰ سلول اضافه شد. البته گروه دیگری از سلول‌ها نیز در این مطالعهٔ تجربی به‌عنوان شاهد، بدون افزودن عصارهٔ باکتریایی و تنها با افزودن Pbs به جای عصاره آزمایش گردیدند و هر آزمایش ۴ بار صورت گرفت؛ سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور حاوی دی‌اکسید کربن قرار داده شد. در این مدت، آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های زنده رنگ زرد MTT را به کریستال‌های فورمازان بنفش‌رنگ تبدیل کرد که نامحلول هستند؛ سپس محیط رویی خارج گردید و پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک، ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. در این مدت، کریستال‌های فورمازان حل شد. در مرحلهٔ آخر جذب نوری با طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا قرائت گردید. درنهایت، درصد زنده بودن سلول‌ها با تقسیم جذب نوری سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های شاهد ضرب‌در ۱۰۰ محاسبه شد و نتایج آن با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در نرم‌افزار آماری SPSS vol.22، در سطح پنج درصد تجزیه‌وتحلیل گردید (۱۳).

استخراج RNA:

از سلول‌های رشد کرده در فلاسک‌های ۶ خانه که به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار با سوپرناتانت با pH=4 و سوپرناتانت با pH=6 قرار گرفته بودند، رسوب سلولی تهیه و محلول رویی دور ریخته شد. برای استخراج از کیت استخراج RNA (RNX Plus، سینا کلون، Cat. No.: EX6101) استفاده گردید. بدین منظور، به رسوب سلولی مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول RNX- Plus اضافه شد تا کاملاً حل شود؛ سپس محلول به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. پس از آن، تیوب به مدت ۵ ثانیه ورتکس و ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. به تیوب‌ها مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به‌آرامی اینورت شد. تیوب‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و 12000 rpm سانتریفوژ گردید و متعاقباً فاز رویی به‌دقت برداشته (فاز وسط نباید برداشته شود) و به تیوب جدید منتقل و هم‌حجمش ایزوپروپانول اضافه شد. پس از ۱۰ ثانیه وارونه کردن (Invert)، تیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار گرفتند و سپس سانتریفیوژ با شرایط rpm 12000 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت و محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول اضافه و به‌آرامی اینورت گردید؛ سپس سانتریفیوژ با شرایط rpm 8000 به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محلول رویی درنهایت دور ریخته شد و تیوب به مدت ۱۵ دقیقه زیر هود قرار گرفت تا به شکل نسبی خشک شود و پس از آن، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب DEPC به تیوب اضافه گردید. RNA استخراج‌شده از سلول شاهد و تیمار روی ژل آگارز بارگذاری و کیفیت RNA استخراجی توسط نانودراپ (ترموساینتیفیک، امریکا) در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت، برای حذف DNA (ژنومی) به ازای هر میکروگرم از نمونه یک واحد آنزیم DNase نیز افزوده گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ حرارت داده شد.

ساخت cDNA:

برای تهیهٔ cDNA از کیت یکتا تجهیز آزما (Cat No: YT4500) استفاده گردید. مطابق دستورالعمل کیت، RNA به مقدار ۵ میکرولیتر، Random hexamer primer به مقدار ۱ میکرولیتر (50 µM) و آب DEPC به مقدار ۷/۴ میکرولیتر (حجم نهایی ۱۳/۴ میکرولیتر است)، باهم مخلوط شد و پس از اسپین کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس روی یخ گذاشته شد. در مرحلهٔ بعد، ۵x first standard به مقدار ۴ میکرولیتر (mM250)، dNTP mix به مقدار ۱ میکرولیتر (10 mM)، RNase inhibitor به مقدار ۰/۵ میکرولیتر (40 u/µl) و M-mlv (H) به مقدار ۱ میکرولیتر (200 u/µl) به تیوب اضافه گردید؛ سپس این مخلوط اسپین شد و درنهایت، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

سانتی‌گراد قرار گرفت. درنهایت، محصول با ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

واکنش Real Time PCR:

به‌منظور بررسی میزان تغییر بیان در ژن‌های Fas، *P53* و Bcl-2، در ردهٔ سلولی AGS از جفت پرایمرهای رفت‌وبرگشت طراحی‌شده برای انجام Real time PCR در جدول شمارهٔ ۱ استفاده شد. پرایمرها توسط نرم‌افزار Gene Runner vol.3.05 طراحی و توالی پرایمرها در پایگاه دادهٔ NCBI بررسی گردید؛ همچنین از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. به همین منظور، در هر میکرو تیوب مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت پرایمر، مقدار ۵ میکرولیتر از مستر سایبر، مقدار ۱ میکرولیتر cDNA سنتز شده و مقدار ۳ میکرولیتر آب تزریقی اضافه و برنامهٔ حرارتی مطابق جدول شمارهٔ ۲ تنظیم گردید (۱۳). درنهایت، با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism vol.8 و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه، بیان ژن‌ها بررسی و مقایسه شد. سطح معنی‌داری P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱. مشخصات پرایمرهای طراحی‌شده

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول محصول (bp)
GAPDH	F:5'- GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC -3'	64	۱۸۳
	R:5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC -3'		
Bcl-2	F:5'-GACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3'	۶۵	۲۴۵
	R:5'-CGGTTCAGGTACTCAGTCATCCAC-3		
Fas	F:5'-GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC-3'	64	۱۶۳
	R:5'- CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC -3'		
P53	F:5'- TCTGACTGTACCACCATCCACTA-3'	۶۵	170
	'R:5'- CAAA ACGCACCTCAA AGC -3		

جدول شماره ۲. برنامهٔ دمایی Real time RT-PCR، ژن‌های Fas، *P53*، *Bcl-2* و *GAPDH*

تعداد سیکل	زمان	درجهٔ سانتی‌گراد
۱	۳ دقیقه	۹۵
۴۵	۲۰ ثانیه	۹۴
	۱۵ ثانیه	۶۲-۵۸
	۲۰ ثانیه	۷۲
۱	۹۹-۶۰	دمای ذوب

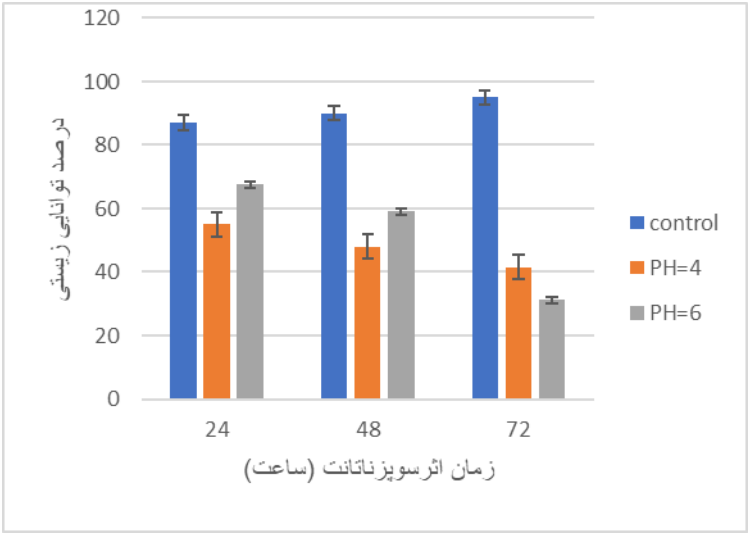
یافته‌های پژوهش

تأثیر سمیت سلولی عصارهٔ باکتری پروبیوتیک بر ردهٔ سلول سرطانی AGS:

نتایج حاصل از سمیت سلولی نشان داد که تعداد سلول‌های AGS تحت تیمار با سوپرناتانت باکتریایی نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است که مؤید تأثیر معناداری این عصاره بر سلول‌های سرطانی معده (AGS) نسبت به گروه شاهد بود ($P<0.05$). تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد که هرچند تراکم سلولی در سلول‌های تحت تیمار با عصاره و سوپرناتانت‌های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود؛ اما این اختلاف تراکم صرفاً در سوپرناتانت با pH=4 و pH=6 آن‌هم در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار بود. درنهایت، مقدار IC50 (غلظتی از نمونه که موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود) محاسبه و این

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

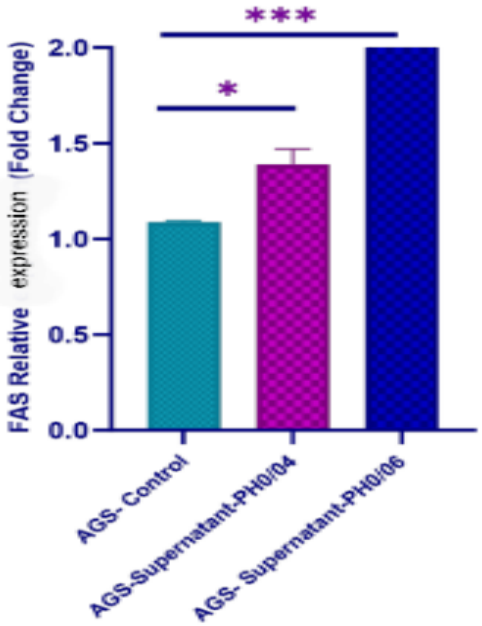
نتایج در نمودار شمارهٔ ۱ ترسیم شد. در این نمودار، محور عمودی درصد توانایی زیستی و محور افقی زمان‌های مختلف انکوباسیون در ردهٔ سلول سرطانی معده (ستون آبی گروه کنترل، ستون نارنجی گروه تیمار سوپرناتانت با pH=4 و ستون خاکستری گروه تیمار با pH=6) را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱. مقایسهٔ درصد زنده‌مانی پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر ردهٔ سلول سرطانی AGS

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی:

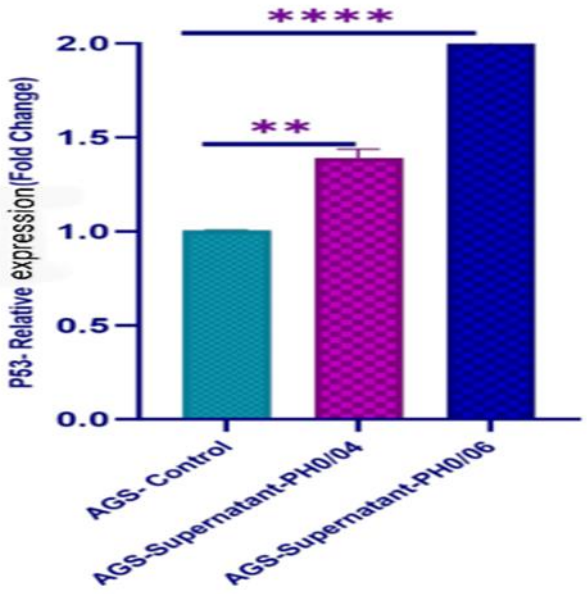
طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف- اسمیروف بررسی و ازآنجاکه داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار بودند، توصیف داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شد. برای محاسبهٔ بیان ژن، چرخه‌های آستانه با نرم‌افزار Rotor-Gene Real Time analysis vol.6 رسم گردید. همان‌طور که در نمودار شمارهٔ ۲ مشخص است، میزان بیان ژن آپوپتوزی Fas در نمونهٔ تیمار نسبت به شاهد افزایش داشته و این اختلاف نیز معنادار است ($P<0.05$). از معنادار بودن اختلاف نتیجه گرفته می‌شود که این سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در القای آپوپتوز اثرگذار بوده است.



نمودار شماره ۲. میزان مقایسه‌ای بیان ژن *FAS*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

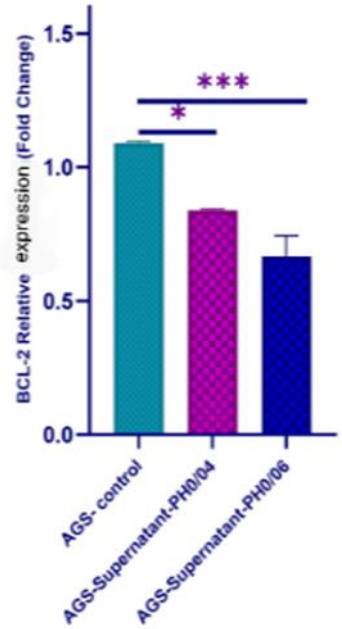
در نمودار شمارهٔ ۲ محور عمودی میزان بیان ژن و محور افقی به‌ترتیب از چپ به راست گروه کنترل، تیمار سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با pH=4 و تیمار سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با pH=6 است. تعداد ستارهٔ متفاوت نشان‌دهندهٔ وجود گروه‌های معنی‌دار و افزایش بیشتر بیان این ژن پس از تیمار با سوپرناتانت پروبیوتیک (P۰/۰۰۰۲=) در مقایسه با سلول‌های کنترل (P۰/۰۱۶۲=) است.



نمودار شماره ۳. میزان مقایسه‌ای بیان ژن *P53*

در نمودار شمارهٔ ۳، محور عمودی میزان بیان ژن و محور افقی به‌ترتیب از چپ به راست گروه کنترل، تیمار سوپرناتانت ب. بیفیدوم با pH=4 و تیمار سوپرناتانت ب. بیفیدوم با pH=6 است. تعداد ستارهٔ متفاوت نشان‌دهندهٔ وجود گروه‌های معنی‌دار و افزایش بیشتر بیان این ژن پس از تیمار با سوپرناتانت پروبیوتیک (P۰/۰۰۰۱=) در مقایسه با سلول‌های کنترل (P۰/۰۰۱۳=) است. همان‌طور که در نمودار شمارهٔ ۳ نیز مشخص است، میزان بیان ژن آپوپتوزی *P53* در نمونه تیمار نسبت به شاهد افزایش داشته است و این اختلاف نیز معنادار است (P۰/۰۵ >). می‌توان از معنادار بودن اختلاف نتیجه گرفت که سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در القای آپوپتوز اثرگذار است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]



نمودار شماره ٤. میزان مقایسه‌ای بیان ژن *BCL2*

در نمودار ۴ محور عمودی میزان بیان ژن و محور افقی به‌ترتیب از چپ به راست گروه کنترل، تیمار سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با pH=4 و تیمار سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با pH=6. تعداد ستاره متفاوت نشان‌دهنده وجود گروه‌های معنی‌دار و کاهش بیشتر بیان این ژن پس از تیمار با سوپرناتانت پروبیوتیک (P۰/۰۰۴۲=) در مقایسه با سلول‌های کنترل (P۰/۰۱۸۸=) است. نتایج به‌دست‌آمده در نمودار ۴ گویای این است که این ژن در نمونه شاهد بیان بالایی داشته است ولی در مورد نمونه تیمار به شکل معناداری کاهش یافته است (P<0.05). معنادار بودن این اختلاف نیز به معنای مؤثر بودن تیمار است.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، سمیت سلولی عصاره و سوپرناتانت *ب. بیفیدوم* بر ردهٔ سلول سرطانی AGS بررسی شد و نتایج نشان داد که سوپرناتانت با pH=6 بیش از سوپرناتانت با pH=4 و این دو بیش از عصارهٔ باکتریایی اثر سمیت سلولی داشتند و بیان ژن‌های آپوپتوزی نیز برای هر سه ژن *Fas*، *P53* و *Bcl2* با اختلاف آماری معناداری همراه بود. هر دو ژن *Fas* و *P53* در نمونهٔ تیمار با پروبیوتیک افزایش بیان داشتند، درحالی‌که ژن *Bcl2* کاهش بیان نشان داد؛ بنابراین، نتایج این تحقیق حاکی از آن است که سوپرناتانت *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* می‌تواند بیان ژن‌های *Fas* و *P53* را تحت تأثیر قرار دهد و درنتیجه، آپوپتوز را در ردهٔ سلول سرطانی AGS القا کند. نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های برخی از محققان دیگر نیز همخوانی دارد، به شکلی که در بررسی اثر پروبیوتیکی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر ردهٔ سلول‌های سرطانی CacoII (ردهٔ سلولی سرطانی رودهٔ بزرگ)، د صد مهاری سوپرناتانت این باکتری ۵۵ تا ۸۸ درصد تعیین شد و یا در ردهٔ سلول سرطان مزمن مغز استخوان (K۵۶۲) در آزمون MTT، حداقل غلظت مؤثر عصارهٔ باکتری بر زنده‌مانی سلول‌ها ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۳). کانو و همکاران نیز مشاهده کردند که تجویز روزانهٔ *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به‌طور چشمگیری شدت التهاب مخاط روده و پاسخ‌های التهابی را کاهش می‌دهد و البته در مقابل، نتوانست از القای آپوپتوز در اولین روز پس از تجویز ۵-FU جلوگیری کند و نتیجه گرفتند که *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از طریق تضعیف پاسخ‌های التهابی، اثر بهبودی در برابر التهاب مخاط روده‌ای ناشی از ۵-FU را دارد و می‌تواند برای پیشگیری از موکوزیت روده در طول شیمی‌درمانی سرطان مفید باشد (۲۴). در مطالعهٔ اثر ضدسرطانی گونه‌های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

بیفیدوباکتریوم در سلول‌های سرطانی رودهٔ بزرگ در نمونهٔ موشی نیز مشاهده شد، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به‌طور چشمگیری شاخص فعالیت بیماری را بهبود می‌بخشد و طول کولون را بازسازی می‌کند و از افزایش بروز و پیشرفت تومورها به مراحل و درجات بالاتر جلوگیری می‌نماید (۲). در ارزیابی آثار آپوپتوزی برخی از گونه‌های *بیفیدوباکتریوم* روی رده‌های سلول سرطانی رودهٔ بزرگ با استفاده از تست فلوسایتومتری نیز مشاهده شده است که سوپرناتانت همهٔ *بیفیدوباکتریوم*‌های مطالعه‌شده به‌طور چشمگیری میزان بقای سلول‌های سرطانی روده را در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش می‌دهند. این نتایج نشان داده است که آپوپتوز توسط متابولیت‌های ترشحی *بیفیدوباکتریوم* القا می‌شود (۲۵). به‌نظر می‌رسد، علاوه بر آثار آپوپتوزی ذکرشده، سازوکارهای دیگری نیز در آثار ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها نقش‌آفرینی کنند. کارسینوژن ۱ و ۲ دی‌متیل هیدرازین در کولون موش با خنثی‌سازی مسمومیت حاصل از موادی که باعث آسیب‌های ژنی در روده می‌گردند، آثار ضدسرطانی را القا و یا ترکیبات متابولیتی جداشده از برخی پروبیوتیک‌ها (اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه، آنزیم محافظت‌کنندهٔ گلوتاتیون ترانسفراز، بوتیرات و...) در غیرفعال کردن عوامل خطر و کارسینوژن ایفای نقش می‌کنند. بر اساس نتایج می‌توان گفت که باکتری ب. بیفیدوم توانایی مهار سلول‌های سرطانی را در شرایط آزمایشگاهی دارد و می‌توان از پروبیوتیک‌ها در تهیهٔ مواد غذایی خوراکی برای پیشگیری از سرطان معده استفاده کرد. برای تکمیل این مطالعه نیاز به تحقیقاتی است که بتوان کارایی آن‌ها را در سطح بالینی نیز سنجید.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله از جناب آقای سهراب صفری که در انجام این پژوهش همکاری شایسته‌ای داشتند، کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌کنند که نتایج این تحقیق با منافع هیچ سازمان یا فردی تعارض ندارد.

کد اخلاق

این تحقیق با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1401.120 در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به تصویب رسیده است.

حمایت مالی

تحقیق حاضر بدون حمایت مالی از طرف هرگونه مؤسسه یا سازمانی و تنها به وسیله هزینه‌های شخصی نویسندگان صورت گرفته است.

مشارکت نویسندگان

دکتر علی شریف زاده به عنوان استاد راهنما، انجام برخی آزمایشات توسط خانم عالی و اجرای پژوهش و نوشتن مقاله توسط هانیه همتیان انجام شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

References

1. Semnani S, Besharat S, Arabali A, Kestkar AA, Roshandel Gh, Abdolahi N, et al. Relation between drinking water hardness and the incidence of esophageal and gastric cancers. J Gorgan Univ Med Sci 2009; 11:76-80.
2. IW CD, Jaia CJ. Gastric cancer epidemiology: current trend and future direction. Hygiene 2023; 3:256-68. doi:10.3390/hygiene3030019.
3. Eom SS, Choi W, Eom BW, Park SH, Kim SJ, Kim YI, et al. A Comprehensive and Comparative Review of Global Gastric Cancer Treatment Guidelines. J Gastric Cancer 2022; 22:3-23. doi: 10.5230/jgc.2022.22. e10.
4. Wang F, Li T, Zhang B, Li H, Wu Q, Yang L, et al. MicroRNA- 19a/b regulates multidrug resistance in human gastric cancer cells by targeting PTEN. Biochem Biophys Res Commun 2013; 434:688-94. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.010.
5. Mocan L. Surgical Management of Gastric Cancer: A Systematic Review. J Clin Med 2021; 10:2557. doi: 10.3390/jcm10122557.
6. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. Int J Cancer 2007; 120:1803-10. doi: 10.1002/ijc.22442.
7. Guan WL, He Y, Xu RH. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives. J Hematol Oncol 2023; 16:57. doi: 10.1186/s13045-023-01451-3.
8. Panda SK, Sahoo PK, Agarwala SK, Houghton TT, Chandrapattan PP, Sankar KV, et al. Evolution of treatment in gastric cancer-a systematic review. J Egypt Natl Canc Inst 2022; 34:12. doi: 10.1186/s43046-022-00114-7.
9. Wong H, Yau T. Molecular targeted therapies in advanced gastric cancer: does tumor histology matter? Therap Adv Gastroenterol 2013; 6:15-31. doi: 10.1177/1756283X12453636.
10. Yaghoobi H, Bandeh poor M, Kazemi B. 2016.Application of bacteria in the treatment of cancer. New Cell Biotech Mol 2016; 26:96-100[Persian].
11. Slizewska K, Kopec PM, Slizewska W. The roles of probiotics in cancer prevention. Cancers 2021; 13: 1-22. doi: 10.3390/cancers13010020.
12. Kumar A, Pramanik J, Goyal N, Chauhan D, Sivamaruthi BS, Prajapati BG, et al. Gut Microbiota in Anxiety and Depression: Unveiling the Relationships and Management Options. Pharmaceuticals 2023;16:565. doi: 10.3390/ph16040565.
13. Faghfoori Z, Faghfoori MH, Saber A, Izadi A, Yari Khosroushahi A. Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. Cancer Cell Int 2021; 21:258. doi: 10.1186/s12935-021-01971-3.
14. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin 2023; 73:17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
15. Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, et al. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. Int J Cancer 2019; 144:2992-3000. doi: 10.1002/ijc.32055.
16. Brenner AT, Dougherty M, Reuland DS. Colorectal cancer screening in average risk patients. Med Clin North Am 2017; 101:755-67. doi: 10.1016/j.mcna.2017.03.007.
17. Asadollahi P, Ghanavati R, Rouhani M, Razavi S, Esghaei M, Talebi M. Anticancer efects of Bifdobacterium species in colon cancer cells and a mouse model of carcinogenesis. PloS One 2020; 15:1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0232930.
18. Nowak A, Paliwoda A, Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and antioxidative activity of Lactobacillus and Bifdobacterium strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. Crit Rev Food Sci Nutr 2019;59:3456-67. doi: 10.1080/10408398.2018.1494539.
19. Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou EE, et al. Lactobacillus casei exerts anti-proliferative efects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. PLoS One 2016; 11:e0147960. doi: 10.1371/journal.pone.0147960.
20. Fahmy CA, Gamal-Eldeen AM, El-Hussieny EA, Raafat BM, Mehanna NS, Talaat RM, et al. Bifdobacterium longum suppresses murine colorectal cancer through the modulation of oncomirs and tumor suppressor mirnas. Nutr Cancer 2019; 71:688-700. doi: 10.1080/01635581.2019.1577984.
21. Miller LE, Lehtoranta L, Lehtinen MJ. 2017. The efect of Bifdobacterium animalis ssp. lactis HN019 on cellular immune function in healthy elderly subjects: systematic review and meta-analysis. Nutrients 2017; 9:191. doi: 10.3390/nu9030191.
22. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. World J Gastroenterol 2014; 20:7878-86. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7878.
23. Zarei L, Abtahim M, Karaje Daghi A, Ismaili H. Direct effect of bifidobacterium cell wall

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]

extract on the proliferation of K562 cancer cell line. J Fasa Univ Med Sci 2016; 7:21-27.
24. Kato S, Hamouda N, Kano Y, Oikawa Y, Tanaka Y, Matsumoto K, et al . Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. Clin Exp Pharmacol Physiol 2017;44:1017-25. doi: 10.1111/1440-1681.12792.
25. Wei H, Chen L, Lian G, Yang J, Li F, Zou Y, et al. Antitumor mechanisms of bifidobacteria(review). Oncol Lett 2018; 16:3-8. doi: 10.3892/ol.2018.8692.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-23]