DOI:10.22092/VJ.2023.360657.2027
شماره ۱۴۱ زمستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک بر روی بیان ژن‌های VDR، IL3 و NOD2 در رده سلولی Caco-2

• **ناهید نورمحمدی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
• **راضیه نظری (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
• **ناصر کلهرقم**
گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مرکز آموزشی، فرهنگی و تحقیقاتی، واحد قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۹-۱۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱-۱۱-۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۱۱-۱۹ تاریخ انتشار:۱۴۰۲-۱۰-۰۱
Email: nazari1102002@yahoo.com

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که به عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی و سرطانی شناخته شده‌اند. در این مطالعه اثرات سمیت سلولی عصاره باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم، بر روی رده سلولی سرطانی کولون (Caco-2) و همچنین بیان ژن‌های VDR، IL3 و NOD2 بررسی شد.

از کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، مایع‌رویی جدا شد. سپس اثرات سمیت سلولی باکتری‌ها و مایع‌رویی بر روی رده سلولی سرطانی Caco-۲با استفاده از روش MTT بررسی شد. همچنین بیان ژن‌های VDR، IL3 و NOD2 با استفاده از روش Real-Time PCR ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شد. بررسی اثر مهاری مایع‌رویی کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر سلول‌های Caco-۲ و بیان ژن در غلظت‌های مختلف نشان داد که مقدار µL/mL ۱۰۰ برای VDR، IL3 و NOD۲ بعد از ۴۸ ساعت به صورت معنادار بالاترین افزایش بیان ژن را داشت. آزمایش MTT نشان داد که غلظت µl/mL ۱۰۰ بیشترین کشندگی حاصل شد. بیان ژن در غلظت µl/mL ۱۰۰ در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای VDR، در زمان ۴۸ ساعت برای IL۳ و در زمان ۷۲ ساعت برای NOD2 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت (P<۰/۰۵). مي‌توان از لاکتوباسیلوس پلانتاروم، جهت ایجاد يك راهكار نوين درماني با تأثير بالا، عوارض جانبي پايين، بي‌خطر از نظر زیستی و هزینه کمتر استفاده کرد. بر این اساس پیشنهاد می‌گردد درمان و پیشگیری از سرطان کولون با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتارم مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیك، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، سرطان، ژن‌های VDR، IL۳ و NOD

● Veterinary Researches & Biological Products No 141 pp: 28-36

Evaluation of probiotic bacteria effect on expression of VDR, IL3 and NOD2 genes in Caco-2 cell line

By: Noormohammadi, N., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. Nazari, R., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. and Kalhorqom, N., Department of Mesanchymal Stem Cell, Academic Center for Education, Culture and Research,Qom branch, Iran.

Received:2022-12-03 **Accepted: 2023-02-08**
Revised:2023-02-08 **Published: 2023-12-22**

Email: nazari1102002@yahoo.com

Probiotics are live and beneficial microorganisms that are known as a factor for prevention of infectious diseases and cancer. In this study, the effects of cytotoxicity of Lactobacillus plantarum extract on the colon cancer cell line (Caco-2) as well as the expression of VDR, IL3 and NOD2 genes were investigated.The supernatant of L. plantarum culture was collected. Then, the effects of cytotoxicity and fluidity of bacteria and Supernatant on Caco-2 cancer cell line were investigated using MTT method. Also, the expression of VDR, IL3 and NOD2 gene was evaluated using Real-Time PCR. Data were analyzed using one-way ANOVA. Investigation of the inhibitory effect of L. plantarum culture supernatant on Caco-2 cells and gene expression at different concentrations showed that 100 µL/mL for VDR, IL3 and NOD2 had the highest increase in gene expression significantly after 48 hours. The MTT test showed the highest lethality at a concentration of 100 µL/mL. Gene expression at 100 µL/mL increased significantly at 24, 48 and 72 h for VDR, 48 h for IL3 and 72 h for NOD2 compared to the control group ($P < 0.05$).

L. plantarum can be used to develop a new treatment strategy with high efficacy, low side effects, biologically safe and lower cost. Based on this, it is suggested to investigate the treatment and prevention of colon cancer using L. plantarum.

Key words: Probiotic, Lactobacillus plantarum, Colon, Vdr, IL3 and NOD2 genes

مقدمه

پروبيوتيك‌ها ميكروارگانيسم‌هاي زنده‌اي هستند كه در مقادير مناسب، تأثيري مثبت بر سلامت ميزبان دارند. اين باكتري‌ها مي‌توانند در شرايط pH پايين دستگاه گوارش زنده مانده و با نابودي ميكروارگانيسم‌هاي مضر داخل روده و همچنين تعادل فلور ميكروبي روده، موجب حفظ سلامتي و افزايش ميزان رشد در انسان و دام گردند (۱۹). از عملكردهاي اين باكتري‌ها مي‌توان به فعاليت ضد ميكروبي، بهبود سوخت و ساز بدن، كاهش كلسترول در سرم خون، تحريك سيستم ايمني بدن، خواص آنتي‌موتاژن، خواص ضد سرطان، خواص ضد اسهال، بهبود بيماري‌هاي التهاب روده و سركوب هليكوباكترها اشاره كرد (۱۳).

پروبیوتیک‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌ها قرار دارند، اما ویژگی پروبیوتیکی لاکتوباسیل‌ها و بیفیدو باکترها بیش از سایر گونه‌ها مورد توجه قرار گرفته است. لاکتوباسیلوس‌ها از فراوانترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی هستند و لاکتوباسیلوس پلانتاروم یکی از باکتری‌های شاخص این گروه است. به نظر می‌رسد مصرف فرآورده‌های غذایی حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، بر عفونت دستگاه گوارش و ابتلا به التهاب روده‌ای اثر کاهشی دارد و تحریک‌کننده سیستم ایمنی هستند (۱۸).

امروزه با پیشرفت علم در زمینه‌های مختلف، توجه محققین به متابولیت‌های ایمن با ویژگی‌های ضد سرطانی که توسط پروبیوتیک‌ها تولید می‌شوند متمرکز شده است. تحقیقات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها با تاثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب جهش‌ها، ترکیبات سرطان‌زا در حیوانات آزمایشگاهی نقش موثری در جهت مقابله با سرطان دارند (۱۴).

به طور کلی سرطان، که در سال‌های اخیر هم شیوع آن افزایش یافته است، دومین علت شایع مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود. یکی از شایع‌ترین نوع سرطان دستگاه گوارش، سرطان روده بزرگ است. عوامل شیمیایی سرطان‌زا و زندگی مدرن ذخایر طبیعی باکتری‌های پروبیوتیک را در درون دستگاه گوارش کم کرده است (۱ و ۹). بعد از سال‌های متمادی برخورد باکتری‌های فلور طبیعی بدن انسان با مواد شیمیایی موجود در غذا و نیز استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و سایر داروها باعث شده است که نوع و مقدار باکتری‌های فلور طبیعی بدن انسان تغییر نماید و زمینه برای ایجاد سرطان کولون فراهم گردد (۸).

پروبیوتیک‌ها در سرکوب زخم‌های نئوپلاستیک و تومورهای سرطانی کولون در مدل‌های موش موثر هستند (۱ و ۲۱). اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد. همچنین یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها از مجله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضد تکثیری سلول‌های سرطانی بخصوص در سرطان کولون با القای آپوپتوز است. شواهد بسیاری وجود دارد که نشان

می‌دهد پروبیوتیک‌ها می‌توانند نقشی در تنظیم تکثیر سلولی و آپوپتوز داشته باشند (۱۴ و ۱۷).

سرطان در نتیجه تغییرات متعدد در چندین ژن مختلف اتفاق می‌افتد. NOD۲، VDR ،IL۳، PTEN و AKT۱ از جمله ژن‌هاي مهمي هستند كه در سرطان كولون دخيل هستند. از آن‌جا كه در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم می‌خورد و سلول‌ها برای رشد وتکثیر بی‌رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند، ارتباط مستقیمی بین بیان ژن‌های موثر در فرایند آپوپتوز و فرایند سرطانی شدن وجود دارد (۳ و ۴). بنابراین بررسی تغییرات این ژن‌ها مانند ژن‌های IL۳، VDR و NOD۲ می‌تواند از جمله هدف‌های درمانی یا تشخیصی در مطالعات سرطان باشد.

با توجه به اینکه باکتری‌های پروبیوتیک از ایجاد سرطان جلوگیری می‌کنند و باعث مهار سلول‌های سرطانی می‌شوند، بدون اینکه اثر مخربی بر سلول‌های سالم داشته باشند، لذا هدف از این مطالعه بررسي اثرات سمیت سلولی عصاره لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی رده سلول سرطانی Caco-۲ و آنالیز بیان ژن‌های IL۳، VDR و NOD۲ در آزمایشگاه بود.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری و کشت

سویه باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم استاندارد (ATCC ۱۴۹۱۷) از کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر ژنتیک تهران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت (De Man, Rogosa and Sharpe (MRS براث کشت داده شد و سپس در شرایط بی‌هوازی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی گراد انکوبه شدند. برای اطمینان از خالص بودن کلنی‌ها، باکتری‌ها در MRS آگار کشت گردیدند. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت حاوی باکتری، در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. بدین ترتیب محلول رویی متابولیت باکتری تهیه گردید.

کشت سلولی

رده سلول سرطانی Caco۲ با شناسه NCBI NO.C۱۳۹ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM غنی شده با گلوکز، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین/استرپتومایسین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و ۵٪ دی‌اکسیدکربن به مدت ۲۰ ساعت قرار داده شدند. زمانی که تراکم سلولی در فلاسک‌ها به بیش از ۸۵٪ کف فلاسک رسید، سلول‌ها برای ادامه رشد، پاساژ (Subculture) داده شدند.

تست MTT (Microculture tetrazolium)

اثر سایتوتوکسیك باکتري روي سلول‌هاي سرطاني با روش رنگ‌سنجي و با استفاده از رنگ تترازوليوم در مقايسه با گروه كنترل بررسي شد. ابتدا تعداد مناسبي (حدود ۵۰۰۰ سلول) از سلول‌هاي Caco۲ در هر يك از چاهك‌ها كشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت از لاکتوباسیلوس پلانتاروم با OD برابر با ۱ به چاهك‌ها افزوده شد و پليت‌ها ۴ ساعت جهت تأثير باكتري‌ها انكوبه شدند. پس از انكوباسيون محيط داخل چاهك‌ها دور ريخته شده و به هر چاهک ۱۱۰ میکرولیتر محیط تازه و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه گرديد. سلول تيمارنشده با باكتري به عنوان كنترل به كار برده شدند. سپس، پليت‌ها ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در تاريكي انكوبه شدند. پس از آن، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO باضافه گرديد. سپس، پليت‌ها ۱۵ دقيقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انكوبه شدند. براي تعيين درصد زنده بودن سلول‌ها، سلول‌ها با تريپان‌بلو رنگ‌آميزي شد. سلول‌های مرده با شستشو خارج شدند و کریستال های فوروزان تولید شده به وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد (۱۱).

The percentage of the viable cells was calculated using the fol-

جدول ۱- پرایمرهاي مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های IL۳، VDR، NOD۲ و GAPDH.

Genes		Sequence (۵'⟶۳')	Tm	Product Size (bp)
GAPDH	F	TGGCTACAGCAACAGGGTG	۵۹,۹۳	۹۲
	R	CTCTTGTGCTCTTGCTGGG	۵۸,۴۵	
VDR	F	CACATTGCTTTGCTTGCCTC	۵۸,۵۷	۹۷
	R	AAAGTCTCCAGGGTCAGGCA	۶۰,۷۷	
IL۳	F	ACACACTTAAAGCAGCCACC	۵۸,۶۸	۱۸۴
	R	GCAGACATGGCAGGAGATTT	۵۸,۴۸	
NOD۲	F	CAGCCAGTATGAATGTGATG	۵۴,۱۶	۱۲۱
	R	ATGTTGTAGAAGGAAGGCAG	۵۵,۰۵	

lowing formula:

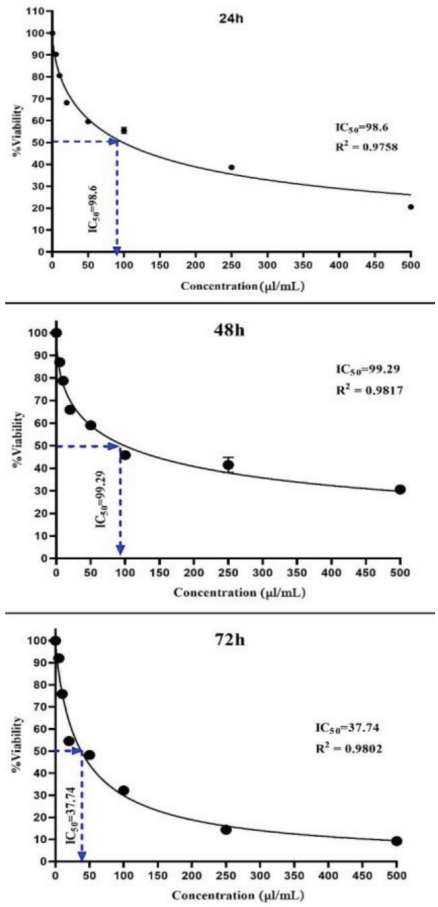
%cytoxicity = [100 × (control abs)/(sample abs)]

استخراج RNA

در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط کیت RiboExTM شرکت GeneAll (کره‌جنوبی، Cat No. ۳۰۱-۰۰۱ / ۳۰۱-۰۰۲) طبق دستورالعمل آن استخراج شد. براي استخراج RNA، به سلول‌هاي تيمار شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ترايزول اضافه شد تا سلول‌ها ليز شوند. به ميكروتيوب‌هاى حاوى سلول‌هاي ليز حدود ۲۰۰ ميكروليتر كلروفرم اضافه شد، سروته گرديد و ۵ دقيقه در دماي ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، ميكروتيوب‌ها ۱۰ دقيقه در ۱۲۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتريفيوژ شد و مايع‌رويي به ميكروتيوب‌هاى جديد منتقل گرديد. سپس، به هر ميكروتيوب ۱ ميلی‌ليتر ايزوپروپانول سرد افزوده شده، سروته گرديده، ۳۰ دقيقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ميكروتيوب‌ها به مدت ۱۵ دقيقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتريفيوژ شد و مايع‌رويي بيرون ريخته شد. ميكروتيوب‌ها در دماي اتاق كاملاً خشك شد و در انتها به هر ميكروتيوب، ۱ ميلی‌ليتر اتانول ۷۰٪ سرد به آن اضافه شد. ميكروتيوب‌ها ۱۰ دقيقه در دماي ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قرار گرفتند تا اتانول آن‌ها تبخير گردد. به ميكروتيوب ۵۰ ميكروليتر آب مقطر عاري از RNase اضافه شد و در آون و دماى ۵۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقيقه قرار گرفت. در نهايت نمونه‌ها در ۷۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. كميت RNA استخراجی با قرائت OD توسط دستگاه نانودراپ (آلمان؛ ۲۰۰۰C-ND) سنجيده شد و كيفيت آن روي ژل آگاروز ۲ درصد براي ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ بررسی گرديد (۱۱). (۱۱).

سنتز cDNA

پس استخراج RNA، با استفاده از كيت شركت پارس طوس (ايران، cDNA(Cat No. A۱۰۱۱۶۱ سنتز شد. به طور خلاصه، به ميكروتيوب ۰/۲ ميكروليتری شركت سازنده، ۲۰۰۰ ng RNA استخراج شده، ۰/۲



شكل ۱- MTT باكتري لاكتوباسيلوس پلانتاروم روي سلول‌هاي سرطاني Caco-۲ پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

میکرومولار هگزامر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر محلول بافر اضافه شد و در نهایت تا حجم ۲۰ µl از DEPC water اضافه گردید. میکروتیوب‌ها با برنامه دمایی ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. پس از سنتز cDNA، نمونه‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱).

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های VDR، IL۳ و NOD۲ توسط نرم افزار oligo۵ و وب‌سایت NCBI طراحی و بلاست شدند. طراحی پرایمر برای ژن GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی انجام گرفت (جدول ۱).

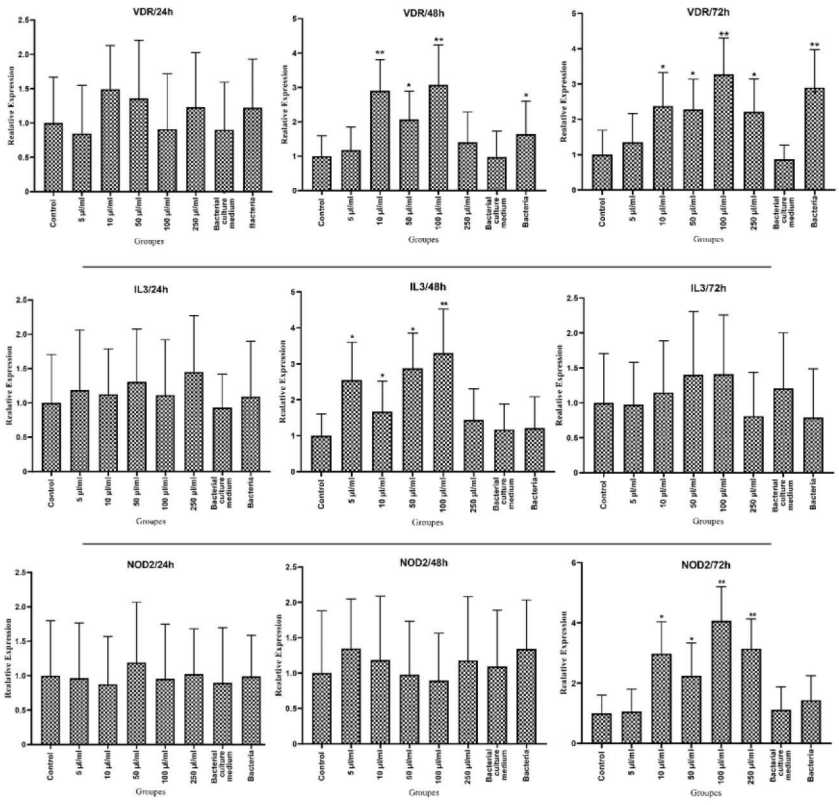
Real-time PCR

حجم نهایی واکنش PCR در ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد که شامل ۱۰ میکرولیتر ۲x Master mix real Q-plus، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۵ pmol/µL)، ۲ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ ng) و ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. برای ژن GAPDH، مقدار ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر استفاده شد. برای انجام PCR چرخه دمایی زیر اعمال گردید:

واسرشت‌سازی اولیه ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۴۰ ثانیه در ۵۹ درجه سانتی‌گراد و طویل سازی ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در ادامه یک چرخه طویل‌سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به دلیل اختصاصي نبودن رنگ فلوروسنت SYBR Green و به منظور اختصاصیت پرایمر و اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصي و بررسي عدم وجود قطعات غیر اختصاصي در محصول، منحنی ذوب (۵۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد با نرخ گرمایش ۰/۱ درجه سانتی‌گراد در ثانیه) رسم گردید. قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند (۱۱ و ۲۰).

محاسبه میزان بیان ژن و آنالیز آماري داده‌ها

در مورد نتایج بدست آمده براي میزان بیان ژن‌ها، ابتدا CTهای بدست



شکل ۲- میزان بیان ژن‌های VDR، IL۳ و NOD۲ در گروه‌های مورد مطالعه در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

آمده براي هر ژن توسط فرمول CTΔΔ-۲ محاسبه گرديد. سپس، ميانگين نتايج بدست آمده توسط نرم‌افزار آماري در هر گروه محاسبه شد. براي تجزيه‌وتحليل داده‌ها از آزمون آماري آناليز واريانس يك‌طرفه استفاده شده و براي مقايسه ميانگين گروه‌ها از آزمون LSD استفاده گرديد. آزمون‌ها زماني معني‌دار در نظر گرفته شدند كه مقدار P<۰/۰۵ بود. نسبت بيان هر ژن نسبت به ژن مرجع با فرمول زير محاسبه شد:

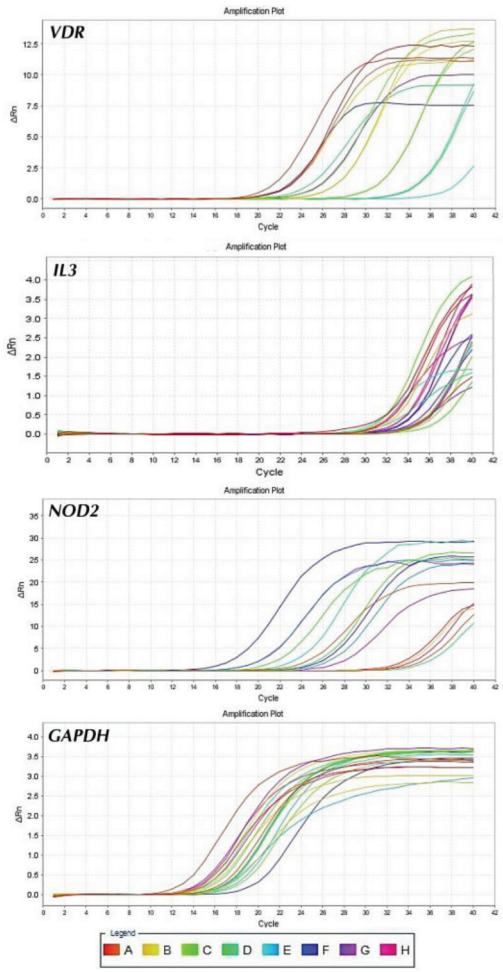
$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP\ target\ (control\text{-}sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP\ ref\ (control\text{-}sample)}}$$

نتايج

آزمايش MTT نشان داد كه بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مقدار IC۵۰ به ترتيب برابر ۹۸/۶، ۹۹/۲۹ بود كه در غلظت ۱۰۰ µl/mL بيشترين ميزان كشندگي را ايجاد كرد. همچنين بعد از ۷۲ ساعت مقدار IC۵۰ برابر ۳۷/۷۴ بدست آمد كه در غلظت ۵۰ µl/mL كمترين ميزان كشندگي را داشت.

بررسی اثر مهاری مایع‌رویی کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر سلول‌های سرطاني Caco-۲ و بیان ژن در غلظت‌های مختلف نشان داد که بیان ژن VDR در ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۱۰ µl/mL، ۵۰ و ۱۰۰ و تیمار شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم، افزایش معنادار داشت (P<۰/۰۲). همچنین بیان ژن VDR و NOD۲ در ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۱۰ µl/mL، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و تیمار شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم، افزایش معناداری داشت (P<۰/۰۱۸). بیان ژن IL۳ در ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۵ µl/mL، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ افزایش معناداری نشان داد (P<۰/۰۱۵). در حالت کلی، غلظت ۱۰۰ µl/mL به ترتیب بعد از ۷۲ و ۴۸ ساعت برای VDR، ۴۸ ساعت برای IL۳ و ۷۲ ساعت NOD۲ به صورت معنادار بالاترین افزایش بیان ژن را داشت.

آنالیز تغییر بیان ژن‌های VDR، IL۳ و NOD۲ در سلول Caco-۲ تیمار



شکل ۳- منحنی تکثیر VDR، IL۳، NOD۲ و GAPDH.

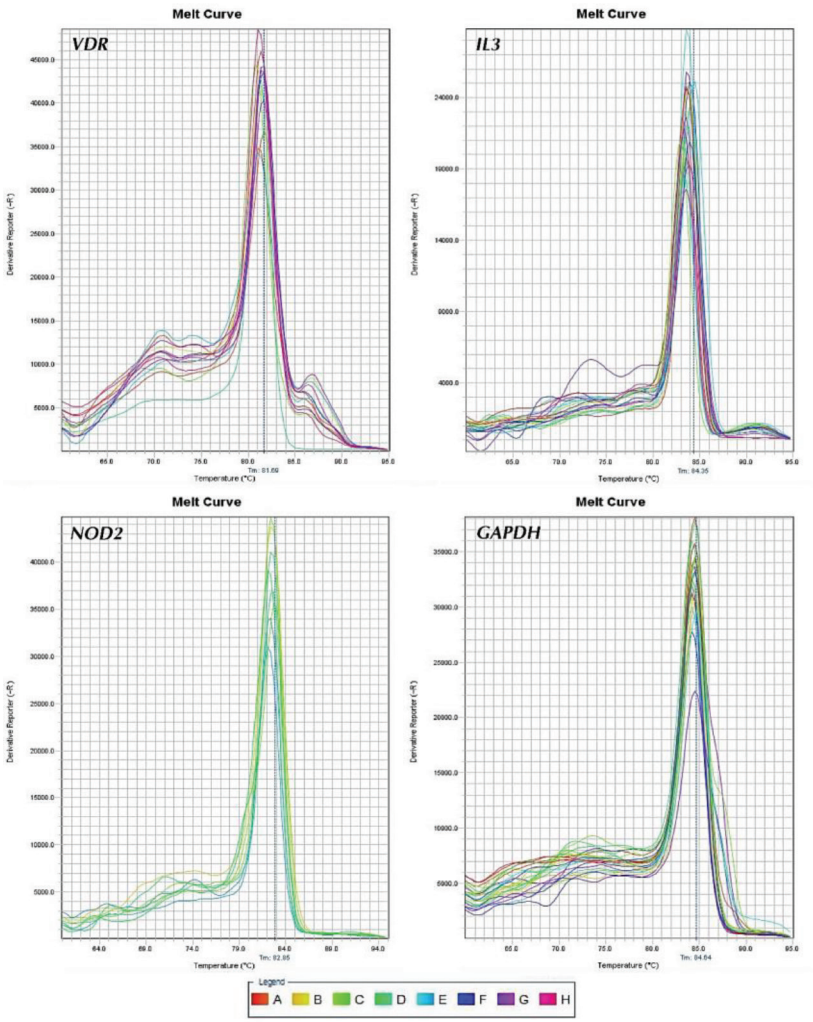
شده با غلظت سمیت سلولی ۵۰ درصد (IC۵۰) عصاره سلولی بعد از ۲۴ ساعت با روش Real time PCR انجام شد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین گردید (شکل ۳ و ۴). نتایج نشان داد که برای ژن‌های IL۳، VDR و NOD۲ و GAPDH به ترتیب از چرخه ۲۰، ۳۰، ۱۸ و ۱۲ به بعد نمودار تکثیر، حالت لگاریتمی پیدا کرده است که نشان‌دهنده تکثیر ژن‌ها می‌باشد.

بحث

امروزه پروبیوتیک‌ها در درمان بسیاري از عفونت‌ها و بیماری‌ها مانند سرطان نقش بسزايي دارند. مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها می‌تواند خاصیت ضد کارسینوژنی داشته باشد و این عمل با خنثی‌سازی مسمومیت ژنوتوکسین‌ها در روده صورت می‌گیرد (۱۴).

مصرف باکتري‌هاي پروبيوتيك يا عصاره اين باکتري‌ها يا تركيباتي از آن‌ها موجب کاهش سرطان کولون و کاهش ظهور تومورها مي‌شود. بررسي‌هاي آزمايشگاهي نشان داده است که اجزاي ديواره سلولي باکتري‌هاي پروبيوتيك با مواد موتاژن ترکیب شده و از شدت سرطان‌زايي آنها مي‌کاهد (۵).

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های آنها می‌توانند نقش‌هایی حیاتی را در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیک ایفا نمایند، در نتیجه انتظار می‌رود که استفاده از آن‌ها در بهبود و درمان بیماری‌های التهابی موثر باشد. باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره آن‌ها با ویژگي ضد التهابی در بیماری‌های التهابی روده معرفي و مطالعه شده‌اند (۱۶). جهت ایجاد هرگونه اثر درمانی توسط باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره آن‌ها، می‌بایستی اثرات ضدالتهابی و آپوپتوزی این سلول‌ها بر روی شرایط التهابی در محیط آزمایشگاهی، مورد بررسی



شکل ۴- منحنی ذوب ژن‌های IL۳، VDR، NOD۲ و GAPDH.

قرار گیرد.

رده سلولی Caco-۲ یک رده مداوم از سلول‌های آدنوکارسینوما کولورکتال اپی‌تلیال ناهمگن انسان است و یکی از خواص مفید آن توانایی تمایز خود به خودی در یک لایه از سلول‌ها با بسیاری از خواص معمولی برای انتروسیت‌های جاذب است که در روده کوچک یافت می‌شوند. این رده سلولی به عنوان یک مدل سلولی مناسب جهت مطالعه و بررسی سرطان مانند سرطان کولون به کار می‌رود (۷).

باکتري لاکتوباسیلوس پلانتاروم تجاري‌ترین پروبیوتیك دنیا مي‌باشد. با وجود استفاده زیاد از این باکتري و ترکیبات آن، هنوز مطالعات موثری در مورد اثرات ضدسرطاني آن گزارش نشده است. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسي میزان بیان ژن‌هاي VDR، IL۳ و NOD۲ در کشت هم‌جوار سلول‌هاي سرطاني کولون Caco-۲ با باکتري لاکتوباسیلوس پلانتاروم مي‌باشد.

نتایج به دست آمده نشان داد که مایع‌رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایي مهار رشد سلول‌هاي سرطاني کولون را در شرایط برون‌تنی دارد. مطالعات مختلفی اثر مهار رشد سلول‌هاي سرطاني را با سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیکی و ژن‌های مختلف دیگر نشان داده‌اند، که نتایج آنها با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. به‌طوری که اکثر این تحقیقات نشان داده‌اند که سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیکی توانایی مهار رشد رده‌های سلول‌های سرطانی مختلف را دارند (۴، ۸، ۹، ۱۳).

Taverniti و همکاران، نشان دادند که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی سبب کاهش درصد بقای سلول‌های سرطانی HT۲۹ و Caco-۲ می‌شوند (۱۵).

Sevda و همکاران با بررسی اثرات سمیت سلولی باکتری‌های مختلف لاکتوباسیل بر سلول‌های سرطانی Caco-۲، نشان دادند که عصاره سویه‌های باکتریایی لاکتوباسیل رشد سلول‌های سرطانی را به شیوه وابسته به دوز مهار می‌کنند (۱۲).

طي مطالعه‌اي توسط Biffi، اثر مهاري ۵ گونه مختلف از باکتري‌هاي اسید لاکتیك روي سلول‌هاي سرطاني سینه (MCFV) بررسی گردید. نتایج نشان داد که هر ۵ گونه لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، بیفیدوباکتریوم اینفانتیس، بیفیدوباکتریوم انیمالیس روي رشد سلول‌هاي سرطاني اثر مهاري داشته و بیشترین اثر مربوط به لاکتوباسیلوس اسدوفیلوس و لاکتوباسیلوس اینفانتیس بود که تا ۸۵ درصد رشد سلول‌هاي سرطاني را مهار کرد (۲).

Yuanchun و همکاران با بررسی اثر ضد سرطانی بر روی دو رده سلولی سرطان روده بزرگ HT۲۹ و Caco-۲ مشخص کردند که این باکتری می‌تواند در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی اثرات ضدسرطانی داشته باشد (۲۲).

Elise و همکاران، نشان داد که ترکیبات تولیدي توسط باسیلوس پلی‌فرمنتیکوس رشد سلول‌هاي سرطاني HT۲۹ و Caco-۲ را به ترتیب ۳۵ تا ۵۶ و ۹۵ تا ۹۹ درصد مهار کرد. او نشان داد که افزایش بیان پروتئین‌هاي ErbB۲ و ErbB۳ در سلول‌هاي سرطاني کولون تحت اثر متابولیت‌هاي این باکتري کاهش یافتند و نتیجه گرفت که متابولیت‌هاي باکتري نسخه‌برداري از این فاکتورها را کاهش مي‌دهند (۱۰).

به طور کلي مي‌توان گفت مکانیسم‌هاي مؤثر در مهار رشد سلول‌هاي سرطاني Caco-۲ توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم کاملاً مشخص نیست ولي با توجه به مطالعاتي که قبلاً در موارد مشابه انجام شده مي‌توان نتیجه گرفت که این باکتري‌ها ترکیبات ضد توموري و ضد سرطاني تولید مي‌کنند و مي‌توانند در رشد و تمایز سلول‌هاي سرطاني نقش داشته باشند و از رشد آنها جلوگیري کند. با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده شد که مایع‌رویی تولیدی در ۷۲ ساعت بیشترین اثر را داشت که این مي‌تواند به دلیل مقدار بیشتر متابولیت‌هاي تولید شده در مایع‌رویی باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاري وابسته به غلظت بود. به طوری که، غلظت ۱۰۰ µl/mL برای IL۳، VDR و NOD۲ به صورت معنادار بالاترین افزایش بیان ژن را داشت.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوزی عصاره سلولی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی رده سلول سرطانی Caco-۲، می‌توان در آینده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم جهت ایجاد یك راهکار نوین درماني با تأثیر بالا، عوارض جانبي کم و با هزینه کمتر براي درمان و همچنین پیشگیري از سرطان کولون بهره برد.

منابع مورد استفاده

1. Arnold, M., Abnet, C.C., Neale, R.E., Vignat, J., Giovannucci, E.L. and McGlynn, K.A. (2020). Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 159: 335-349.

2. Biffi, A., Coradini, D., Larsen, R., Riva, L. and Di Fronzo, G. (1997). Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutrition and Cancer* 28: 93-99.

3. Carnero, A. and Paramio, J.M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models. *Frontiers in Oncology* 4: 1-6.

4. Dong, L.M., Potter, J.D., White, E., Ulrich, C.M., Cardon, L.R. and Peters, U. (2008). Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA* 299: 2423-2436.

5. Gahyva, S.M. and Siqueira, J.F. (2005). Direct genotoxicity and mutagenicity of endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems. *Journal of Applied Oral Science* 13: 387-392.

6. Gigola, G., Carriere, P., Novoa Díaz, M.B., Perdigon, G., Zwenger, A.O. and Gentili, C. (2021). Survival effect of probiotics in a rat model of colorectal cancer treated with capecitabine. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 13: 1518-1531.

7. Hirata, M., Bamba, T. and Hosoda, S. (1993). The human colon cancer cell line CaCo-2 produces secretory components during enterocytic differentiation. *Japanese Journal of Gastroenterology* 28: 528-534.

8. Kruis, W. (2004). Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 20: 75-

78.
9. Kuntz, S., Krieghoff-Henning, E., Kather, J.N., Jutzi, T., Höhn, J. and Kiehl, L. (2021). Gastrointestinal cancer classification and prognostication from histology using deep learning: Systematic review. *European Journal of Cancer* 155: 200-215.
10. Ma E.L., Choi, Y.J., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, S.H. and Im, E. (2010). The anticancer effect of probiotic Bacillus polyfermenticus on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *International Journal of Cancer* 127: 780-790.
11. Sattari, S. and Ahmadizadeh, C. (2018). The study of expression of PTEN and AKT1 genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with Streptococcus thermophilus. Feyz 22: 624-631.
12. Sevda, E.R., Kopara, A.T. and Kivance, M. (2015). Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Journal of Biology* 39: 23-30.
13. Shi, L.H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Mohd Ismail, N.I. and Yin, O.S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research* 27: 73-90.
14. Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć P. and Śliżewska, W. (2020). The Role of probiotics in cancer prevention. *Cancers (Basel)* 13: 1-8.
15. Taverniti, V. and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition* 6: 261-274.
16. Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y. and Ding, Q. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic Lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Frontiers in Nutrition* 7: 1-7.
17. Tripathy, A., Dash, J., Kancharla, S., Kolli, P., Mahajan, D. and Senapati, S. (2021). Probiotics: A promising candidate for management of colorectal cancer. *Cancers* (Basel) 13: 1-8.
18. Vlasova, A.N., Kandasamy, S., Chattha, K.S., Rajashekara, G. and Saif, L.J. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 172: 72-84.
19. Williams, N.T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* 67: 449-458.
20. Wu, S., Yoon, S., Zhang, Y.G., Lu, R., Xia, Y. and Wan, J. (2015). Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 309: 341-349.
21. Yavari, M. and Ahmadizadeh, C. (2020). Effect of the cellular extract of co-cultured Lactobacillus Casei on BAX and human β-Defensin 2 genes expression in HT29 cells. *The Horizon of Medical Sciences* 26: 364-381.
22. Yue, Y., Ye, K., Lu, J., Wang, X., Zhang S. and Liu, L. (2020). Probiotic strain Lactobacillus plantarum YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 127: 1-8.