

تأثیر لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس (+NIS) بر بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* ضد آپوپتوز رده سلولی سرطان کلیه

کیومرث امینی^{۱*}، حامد آزادی‌فر^۲

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۸/۲۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۱۰/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس به‌عنوان یک پروبیوتیک در درمان و پیشگیری سرطان نقش کلیدی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس تولیدکننده باکتریوسین‌ها قادر به مهار رشد طیف وسیعی از باکتری‌ها، به‌خصوص سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس (+NIS) بر بیان ژن‌های ضد آپوپتوز رده سلولی سرطان کلیه است.

مواد و روش کار: پس از جداسازی و بررسی ۶۰ سویه پروتئوس میرابیلیس توسط تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی، واکنش *Multiplex PCR* جهت شناسایی ژن‌های ضد آپوپتوز رده سلولی سرطان کلیه انجام شد. پس از کشت و تهیه سوپرناتانت تولیدکننده نایسین، لاکتوکوکوس لاکتی (*PTCC1336*)، فعالیت آن توسط چاهک گذاری در آگار بررسی گردید. توسط واکنش *Real-Time PCR* بیان ژن *AcrB* در سویه‌های پروتئوس میرابیلیس تیمار شده با سوپرناتانت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از بررسی‌های سمیت سلولی این سوپرناتانت، بیان نسبی ژن‌های *bcl-2* و *bax* در سلول‌های سرطانی کلیه مورد مطالعه قرار گرفت. نایسین تهیه‌شده بر روی سویه‌های پروتئوس میرابیلیس به دلیل تحرک و فاکتورهای حدت آن، اثر مهاری اندکی داشت. تجزیه و تحلیل سنجش *MTT* نشان داد که میزان بقای سلولی در سلول‌های سرطانی تیمار شده، با گذر زمان و افزایش غلظت سوپرناتانت بدون سلول لاکتوکوکوس لاکتیس به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. از میان ۶۰ نمونه پروتئوس میرابیلیس، ۳۷ نمونه واجد ژن *AcrA*، ۵۹ نمونه واجد ژن *AcrB* و ۵۸ نمونه دارای ژن *Urea* بودند. با توجه به آنالیز داده‌های تست *MTT* مقدار غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (*IC50*) برای این سوپرناتانت پس از گذر ۷۲ ساعت $2.02/8 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان از کاهش ۵۲/۸۶ درصدی بیان ژن *bcl-2* و افزایش ۶۰/۲۱ درصدی بیان ژن *bax* در سلول‌های سرطانی تیمار شده نسبت به گروه کنترل است. بررسی‌های سمیت سلولی در این تحقیق که با *IC50* معادل $2.02/8$ میکروگرم/میلی‌لیتر قادر به سرکوب تکثیر سلول‌های سرطانی کلیه (*ACHN*) بود. هدف مطالعه بررسی اثرات لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس (+NIS) بر ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلیه بود که این لیزات توانستند بیان ژن *bcl-2* را کاهش داده و ژن *bax* را افزایش دهد، و نشان‌دهنده القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است.

کلیدواژه‌ها: پروتئوس میرابیلیس، لاکتوکوکوس لاکتیس، نایسین، سرطان کلیه، پروبیوتیک

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره هشتم، ص ۶۹۴-۶۷۹، آبان ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، تلفن: ۰۹۱۸۴۳۶۶۲۸۴

Email: DR_Kumarss_Amini@yahoo.com

مقدمه

در صنایع غذایی برای تولید غذاهای تخمیری استفاده می‌شود، پتانسیل آن به‌عنوان میزبانی برای بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های همولوگ و هترولوگ نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۲). رشد لاکتوکوکوس لاکتیس آسان و ارزان بوده و انواع زیادی از روش‌های ژنتیکی و سیستم‌های ناقل در دسترس هستند و به‌خوبی توسعه یافته‌اند. لاکتوکوکوس لاکتیس یک باکتری اسیدلاکتیک

لاکتوکوکوس لاکتیس، یک باکتری گرم مثبت، در آغاز قرن بیست و یکم به‌عنوان یک جایگزین خوب برای بیان عملکردی پروتئین‌های غشایی (*MPS*) پروکاریوتی و یوکاریوتی ظاهر شد. باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در مدت کوتاه تکثیرشده و با متابولیسم تخمیری یا تنفسی رشد می‌کند (۱). اگرچه تا حد زیادی

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

آپوپتوز یک مرگ خودکار سلولی است که در دو مسیر اتفاق می‌افتد: ۱- مسیر درونی و ۲- مسیر بیرونی. اولین مسیر آپوپتوز با واسطه میتوکندری است که با دخالت خانواده ژن *BCL-2* اتفاق می‌افتد. خانواده ژن *BCL-2* شامل چندین پروتئین است که در دو خوشه مشخص هستند. اولین خوشه حاوی پروتئین‌ها از طریق ویژگی‌های حمایتی آپوپتوز، از جمله *BAK* و *BAX* است.

اعضای خانواده پروتئین لنفوم ۲ سلول (*BCL-2*) تنظیم‌کننده‌های کلیدی با فعالیت‌های پرو آپوپتوز و ضد آپوپتوز هستند. *BCL-2* مشخص‌ترین پروتئین ضد آپوپتوز در خانواده پروتئین *BCL-2* است. اندازه پروتئین *BCL-2* ۲۶ کد است و روی کروموزوم ۱۸ قرار دارد می‌تواند با تشکیل هتروداپیر با *BAX*، آپوپتوز را مهار کند و با تنظیم غلظت *Ca2+* و اثر آنتی‌اکسیدانی، بقای سلول را تضمین کند (۷). بیان ژن *Bax*، *Bcl-2*، دو ژن مرکزی پیچیده در آپوپتوز هستند و ژن‌های *Rho-GDI2* و *CEA* را تکمیل کنند.

علاوه بر این، همچنین می‌تواند فعالیت کاسپازهای ۹، ۳، ۶ و ۷ را مهار کند، در نتیجه آپوپتوز را مهار کرده، زمان بقای سلول‌های تومور را طولانی‌تر می‌کند و باعث تبدیل بدخیم سلول‌ها می‌شود (۸). *Bax* که به‌عنوان پروتئین تشکیل‌دهنده منافذ نیز شناخته می‌شود، پس از فعال شدن، منافذی را در غشای خارجی میتوکندری ایجاد می‌کند که در نتیجه یکپارچگی غشاء از بین می‌رود و سیتوکروم *c* آزاد می‌شود (۹).

آپوپتوز با مهار آزادسازی سیتوکروم *C* با مهار ورود *BAX* به غشای میتوکندری یا مهار مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت کانال‌های *BAX* تنظیم می‌شود. هنگامی که سلول‌ها به سیگنال‌های آپوپتوز مانند آسیب یا تحریک پاسخ می‌دهند، *Bax* در سطح میتوکندری جابجا می‌شود و با برهم زدن یکپارچگی غشای میتوکندری نقشی ایفا می‌کند. فعالیت *Bax* عمدتاً توسط تومور *P53* و سایر اعضای خانواده *BCL-2* در تنظیم مقدار تجمع سیتوپلاسم مهار می‌شود (۱۰).

انواع اصلی سرطان کلیه عبارت‌اند از سرطان سلول کلیه (*RCC*)، سرطان سلول انتقالی (*TCC*)، *RCC* تقریباً ۸۰ درصد از سرطان‌های کلیه را شامل شده ولی *TCC* بیشتر بقیه سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد. عوامل خطر برای *RCC* و *TCC* عبارت‌اند از سیگار کشیدن، داروهای ضد درد خاص، سرطان مثانه قبلی، اضافه‌وزن، فشارخون بالا، برخی مواد شیمیایی و سابقه خانوادگی. تشخیص ممکن است بر اساس علائم، آزمایش ادرار و تصویربرداری پزشکی مشکوک باشد. با بیوپسی بافت تأیید می‌شود (۱۱).

رده سلولی *ACHN* سومین رده سلولی رایج است که در مقالات ذکر شده است، علیرغم اینکه از سلول‌های *RCC* پاپیلاری مشتق شده است. هنگام بررسی جهش‌های کلیدی *RCC*، سلول‌های

است که به‌طور پروبیوتیک در صنایع غذایی کاربرد دارد. برخی سویه‌های جدا شده از این باکتری توانایی تولید نایسین را دارند. این ماده یک باکتریوسین با خاصیت ضدباکتریایی علیه چندین میکروارگانیسم و بخصوص باکتری‌های گرم مثبت است. با توجه به اینکه، نایسین تنها باکتریوسینی است که *FDA* به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی تأیید شده است (۲).

بنابراین، لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل فعالیت پروتئولیتیک متوسط، عدم تشکیل داخل بدن و عدم تولید اندوتوکسین و هدفگیری کارآمد *MPs* ها در یک غشای پلاسمایی منفرد، یک میزبان جایگزین جالب برای بیان ژن به‌ویژه برای *MPs* در سلول یوکاریوتی است. عدم وجود اندوتوکسین امکان استفاده از باکتری یا پروتئین تولیدشده توسط باکتری را برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی و درمانی فراهم می‌کند (۳). لاکتوکوکوس لاکتیس به‌طور کلی توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (*USFDA*) به‌عنوان ماده ایمن (*GRAS*) شناخته شده است و متابولیت‌های ضد میکروبی آن، به‌ویژه نایسین، برای کنترل باکتری‌های فاسد و پاتوژن‌های غذایی در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین از این باکتریوسین به‌عنوان القاکننده آپوپتوز استفاده شده است. انواع مختلفی از نایسین شناسایی شده است و این ماده تکثیر سلولی را در سلول‌های *ACHN* کاهش می‌دهد، بنابراین اخیراً برای جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی از طریق فرآیند آپوپتوز تأیید شده است. لاکتوکوکوس لاکتیس اجسام آنکولوزیون را تشکیل نمی‌دهد، زیرا *mRNA* های مقاوم *MP* تجمع خوشه‌ای ایجاد کرده و از تقسیم سلولی جلوگیری می‌کنند (۴). آماده‌سازی نایسین یا خالص نایسین را می‌توان با کشت سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس تولیدکننده نایسین و سپس با روش‌های استخراج و خالص‌سازی مناسب به دست آورد. در مطالعه ۴۰ سویه از نوع وحشی لاکتوکوکوس لاکتیس نشان داد که ۳۵ سویه قادر به تولید نایسین بودند. سیستم *NICE* (بیان ژن کنترل‌شده با نایسین) که به شدت تنظیم شده است، گسترده‌ترین و متداول‌ترین سیستم بیان ژن در لاکتوکوکوس لاکتیس است (۵).

این سیستم بیان امیدوارکننده و مؤثر برای باکتری‌های اسیدلاکتیک ایجاد شده و بر اساس ژن‌های دخیل در بیوسنتز و تنظیم پپتید ضد میکروبی، نایسین (محصول ژن *nisa*) است. این باکتریوسین ۳۴ آمینواسید تولیدشده توسط چندین سویه از لاکتوکوکوس لاکتیس همچنین می‌تواند به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی مواد غذایی استفاده شود. ژن‌های سیستم انتقال سیگنال دوجزئی، *nisR* و *nisK* از خوشه ژنی نایسین، به کروموزوم لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کریموریس *MG1363* (نایسین منفی) وارد شدند تا سویه *NZ9000* ایجاد شود (۶).

سانتی گراد رسوب داده شدند. در نهایت از سوپرناتانت به عنوان عصاره سیتوپلاسمی استفاده شد. سوپرناتانت جداسازی و با فیلتر سرنگ ۰/۲ میکرون استریل و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۴).

آماده سازی پرایمرها: با مراجعه به سایت مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمراهای مناسب برای ژن های *bcl-2* و *bax* و *GAPDH* انتخاب شد. پرایمرها در سایت <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> مقایسه و بلاست شدند به شرکت پیشگامان سفارش داده شدند. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شدند. در جدول ۱ توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است (جدول ۱).

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت پیشگامان انتقال ژن بر طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی انجام شد. پس از استخراج DNA، سنجش کیفی و کمی DNA با استفاده از دستگاه فلورومتر و الکتروفورز کوتاه صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Multiplex PCR

یکی از متداول ترین فن‌های مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است که امکان تقویت و شناسایی توالی‌های DNA خاص را فراهم می‌کند. جهت انجام PCR از Master mix شرکت سیناژن که حاوی آنزیم *Taq DNA polymerase* (۰/۵ واحد بین‌المللی بر لیتر)، *Mgcl2* (۴ میلی‌مول بر لیتر) و *dNTP* (۴ میلی‌مول بر لیتر) استفاده شد. برای کنترل مثبت از سویه استاندارد *PTCC 1336* استفاده شد و از آب مقطر فاقد DNA به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

حجم هر نمونه واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته و در حجم موردنظر بین میکروتیوب‌ها تقسیم شد. پس از مخلوط کردن مواد واکنش جهت انجام PCR میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به دستگاه ترموسایکلر که از قبل روشن شده و درجه حرارت آن برای مراحل مختلف بر اساس راهنما، انتقال داده شد. برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR با استفاده از پرایمراهای جلودار و برگشتی (بر اساس راهنمای زیر) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل: ۳۵ چرخه، واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سلسیوس و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۳۰ ثانیه بودند.

بررسی اثرات ضد میکروبی به روش میکروبرهات دایلویشن (MIC): برای تعیین MIC با لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس

ACHN فاقد جهش در ژن‌هایی از جمله *SETD2*، *PBRM1*، *VHL*، *BAP1* و *TP53* بودند. از نظر بافت‌شناسی، زئوگرافت‌های مشتق شده از سلول‌های *ACHN* تمایل به نشان دادن کارسینوم ضعیف با ویژگی‌های تهاجمی دارند (۱۱، ۱۲).

در سلول سرطانی مورد مطالعه، بیان ژن‌های *bcl-2*، *bax*، *cea* و *rho-gdi2* با قرار گرفتن در معرض نایسین به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. نتایج نشان داد که نایسین دارای اثرات سیتوتوکسیک روی سلول‌های *ACHN* و ۵۶۳۷ است و باعث آپوپتوز در رده سلولی ۵۶۳۷ می‌شود. علاوه بر این، نایسین ممکن است فرآیند متاستاز را از طریق افزایش تنظیم ژن *rho-gdi2* سرکوب کند (۱۳). در پژوهشی اثر نایسین بر آپوپتوز و متاستاز سلول‌های کارسینوم مثانه انسانی ۵۶۳۷ و کارسینومای کلیه (*ACHN*) انجام شد. بیشترین میزان سمیت سلولی زمانی مشاهده شده است که سلول‌ها در معرض بالاترین دوز نایسین قرار گرفتند. علاوه بر این، نایسین می‌تواند آپوپتوز قابل توجهی را در رده سلولی ۵۶۳۷ در مقایسه با گروه درمان نشده القا کند. رده‌های سلولی ۵۶۳۷ و *ACHN* کشت داده شدند و با تراکم‌های مختلف نایسین تیمار گردیدند. آزمون سمیت سلولی توسط روش *MTT* مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح بیان ژن *cea*، *bcl-2*، *bax* و *rho-gdi2* توسط *Real-time PCR* مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۴۳۰ و ۲۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نایسین به ترتیب می‌تواند تکثیر رده‌های سلولی *ACHN* و ۵۶۳۷ را سرکوب کند (۱۳). هدف از این پژوهش، اثر نایسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس بر بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* و القای آپوپتوز در رده سلولی *ACHN* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی بوده و میکروارگانیسم تولیدکننده نایسین، لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس (*PTCC 1336*) تهیه شد. باکتری‌های لیوفیلیزه (لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس *PTCC 1336*) به مدت ۷۲ ساعت در محیط *MRS (Man, Rogosa, Sharpe)* براث کشت داده شدند و سپس در دمای اتاق (۳۰ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شدند (۱۴، ۱۵). پس از کشت و انکوباسیون، سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچالی (۳۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) برداشت شد. سپس رسوب حاصل دو بار با بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH ۹/۹) شسته شد. باکتری‌ها با استفاده از روش *Freeze-Thaw* لیز شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ سونیک (امواج صوتی) گذاشته شدند. دیواره‌های سلولی از سوپرناتانت با سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه

برای اندازه‌گیری حساسیت شیمیایی رده‌های سلولی سرطان ریه انسان اکتباس شده است. این سنجش مبتنی بر تبدیل *MTT* به کریستال‌های بنفش - آبی رنگ فورمازان، توسط سلول‌های زنده است که عملکرد میتوکندری را نشان می‌دهد. به‌عنوان اولین سنجش زنده‌ماندن سلولی طراحی شده برای پلیت‌های ۹۶ خانه برای غربالگری با توان بالا شناخته شده است. در روش *MTT*، نمک تترازولیوم توسط آنزیم دهیدروناز موجود در سلول‌های زنده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به رنگ فورمازان نامحلول کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نمک فورمازان نامحلول با افزودن عوامل انحلال‌کننده حل می‌شود و محصول رنگی به‌صورت کمی در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی چند صفحه‌خوان اندازه‌گیری شد (۱۷).

روش‌های مختلفی برای حل‌شدن محصول فورمازان، تثبیت رنگ، جلوگیری از تبخیر و کاهش تداخل فنل قرمز و سایر اجزای محیط کشت استفاده شده است. روش‌های مختلف انحلال شامل استفاده از ایزوپروپانول اسیدی، دی متیل سولفوکسید (*DMSO*)، دی متیل فرامید (*DMF*)، سدیم دودسیل سولفات (*SDS*) و ترکیبی از مواد شوینده و حلال آلی است. سلول‌های مرده توانایی کاهش نمک‌های تترازولیوم را به محصولات رنگی فورمازان از دست می‌دهند. سلول‌های زنده با متابولیسم فعال، *MTT* را به یک محصول فورمازان بنفش‌رنگ با حداکثر جذب ۵۷۰ نانومتر تبدیل می‌کنند، بنابراین، شدت محصول رنگی به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده موجود در کشت متناسب است (۱۸).

برای سنجش *MTT*، سوپرناتانت‌های استریل شده با فیلتر از کشت‌های یک شبه سویه لاکتوکوکوس لاکتیس به‌عنوان تیمار استفاده شد. رده سلولی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه (1×10^6 سلول در پلیت) قرار داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، رده سلولی با رقت‌های سریالی از سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس (غلظت‌های نهایی ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شد. سپس پلیت به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر *MTT* (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین) به هر چاهک اضافه کرده و پلیت به مدت ۳ ساعت در تاریکی انکوبه شد. سپس مخلوط از چاهک‌ها دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر *DMSO* (دی متیل سولفوکسید) به تک‌لایه سلول‌ها اضافه شد تا رسوبات فورمازان حل شود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا اندازه‌گیری شد (۱۹).

درصد زنده‌ماندن سلول با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

لاکتیس از روش براث دابلوشن مطابق با استانداردهای *CLSI* با کمک میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. رقت‌های متوالی از لیزات پروبیوتیک به همراه غلظت ثابتی از سوسپانسیون باکتری (کدورت نیم مک فارلند) در میکروپلیت با هم مجاور شد. بعد از گذشت مدت‌زمان معین میکروپلیت‌ها از انکوباتور خارج و به‌صورت چشمی قرائت شد. گوده‌ای که مانع رشد باکتری گردیده به‌عنوان *MIC* در نظر گرفته شد (۱۶).

مراحل استخراج RNA

با استفاده از کیت استخراج *RNA* شرکت کارمانیا پارس ژن و طبق دستورالعمل کیت استخراج *RNA* موردنظر انجام شد و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج *RNA* شرکت کارمانیا پارس ژن مراحل طی شد.

سنتز cDNA

مواد و وسایل لازم جهت سنتز *cDNA* شرکت کارمانیا پارس ژن می‌توان به *Random Hexamer*، *cDNA Master Mix*، *Oligo Dt* و *Template RNA*، سانتریفیوژ، لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری و دستگاه اشاره داشت و دستورالعمل سنتز *cDNA* به شرح زیر است: مواد طبق دستورالعمل جدول زیر مخلوط شدند و سپس به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس برای غیرفعال کردن آنزیم *RT*، مخلوط را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

برنامه دمایی برای انجام آزمون Real-Time PCR

دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای دناتوراسیون ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طولیل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. این آزمون در ۴۰ چرخه به سه بار تکرار انجام گردید. تفسیر نتایج با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ است. درنهایت بیان ژن‌های مذکور تحت تأثیر لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس با روش *Real-Time PCR* مورد بررسی قرار گرفت.

کشت و پاساژ رده سلولی: رده سلولی سرطان کلیه (*ACHN*) در محیط *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (*DMEM*) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (*FBS*) و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین ($10000 IU/ml$ و $10000 IU/ml$) میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. برای حفظ کشت، سلول‌ها پاساژ داده شدند.

سنجش سمیت سلولی

سنجش *MTT* یک آزمایش رنگ‌سنجی ساده برای تکثیر و بقای سلولی است که توسط *T.Mosmann* توسعه‌یافته و توسط *Cole*

سلولی سرطان کلیه در حالت‌های تیمار شده با سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس و با نمونه غیر تیمار انجام شد.

برنامه دمایی برای انجام آزمون *Real-Time PCR* شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، دمای دناتوراسیون ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طولی شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. این آزمون در ۴۰ چرخه با سه بار تکرار انجام شد. تفسیر نتایج با استفاده از $\Delta\Delta CT$ است. در نهایت بیان ژن‌های مذکور تحت تأثیر لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس با روش *Real time PCR* مورد بررسی قرار گرفت.

$$\% \text{ Cell Viability} = \frac{A_{570} \text{ sample} - A_{570} \text{ blank}}{A_{570} \text{ control}} \times 100$$

محاسبه غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (*IC50*) سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس

پس از محاسبه درصدهای بقا برای سلول‌های تیمار شده رده سلولی سرطان کلیه، غلظتی از سوپرناتانت که درصد بقای سلولی ۵۰ درصد را داشت و به‌عنوان *IC50* تعیین شد. نمودار مربوط به *IC50* توسط برنامه *EXCEL* و *GRAPH PAD* رسم گردید. این مقدار مبنای انجام تست *Real-Time PCR* قرار گرفت. آزمون *Real-Time PCR* به‌منظور بررسی بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* رده

جدول (۱): آغازگرهای (پرایمرهای) مورد استفاده در *Real-Time PCR* (۲۰)

ژن	توالی	سایز (bp)
bcl-2	F= GTGGATGACTGAGTACCT R= CCAGGAGAAATCAAACAGAG	۱۱۸
bax	F= CTACAGGGTTTCATCCAG R= CCAGTTCATCTCCAATTCG	۱۳۳
GAPDH	F= GAGAAACCTGCCAAGTATG R= GGAGTTGCTGTTGAAGTC	۱۲۳

مورد تحلیل قرار خواهد گرفت. $P\text{-Value} \leq 0.05$ به‌عنوان حد معنی‌دار در نظر گرفته خواهد شد. برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار *SPSS* نسخه ۲۴ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج کشت و تهیه لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس

میکروارگانسیم تولیدکننده نایسین، *Lactococcus lactis* *MRS* (PTCC 1336) به مدت ۷۲ ساعت در محیط *ssp lactis* براث کشت داده شد و در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس تهیه و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی فعالیت نایسین با روش چاهک گذاری انجام شد. در این بررسی نایسین تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس، به‌طور وسیعی توانست منجر به مهار رشد سویه استاندارد میکروکوکوس لوتئوس گردد. اما نایسین تهیه شده بر روی سویه‌های پروتئوس میرابیلیس به دلیل تحرک و فاکتورهای حدت آن، اثر مهاری اندکی داشت.

بررسی میزان سمیت لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی رده سلولی سرطان کلیه (*ACHN*) با روش

MTT

سنجش *MTT* برای تعیین اثرات مهاری عصاره سیتوپلاسمی

بنابراین کمی‌کردن *RNA* بسیار وابسته به آزمایش و ذاتاً متغیر است. باید دقت زیادی کرد تا پارامترهای مختلف تحت کنترل باشند تا بتوان داده‌های به دست آورد که از نظر تکنیکی دقیق و معتبر هستند تا بتوان به دنبال ارتباط و تفسیر زیستی آن رفت. صرف‌نظر از دستگاه مورد استفاده برای انجام واکنش *Real-Time PCR*، شرط‌های بنیادی مشخصی باید برقرار باشد.

واکنش *Real-Time PCR* برای ژن‌های مورد بررسی و با استفاده از ژن مرجع انجام شد. داده‌های *Real-Time PCR* به کمک نرم‌افزار اکسل به روش $\Delta\Delta CT$ آنالیز شد و فرمول زیر تجزیه و تحلیل آماری شد. به‌منظور بررسی معنادار بودن و یا نبودن نیز از روش آزمون آماری *T-test* استفاده شد و میزان *P-value* محاسبه گردید.

$$\Delta CT_{\text{treat}} = CT_{\text{gene-treat}} - CT_{\text{housekeeping-treat}}$$

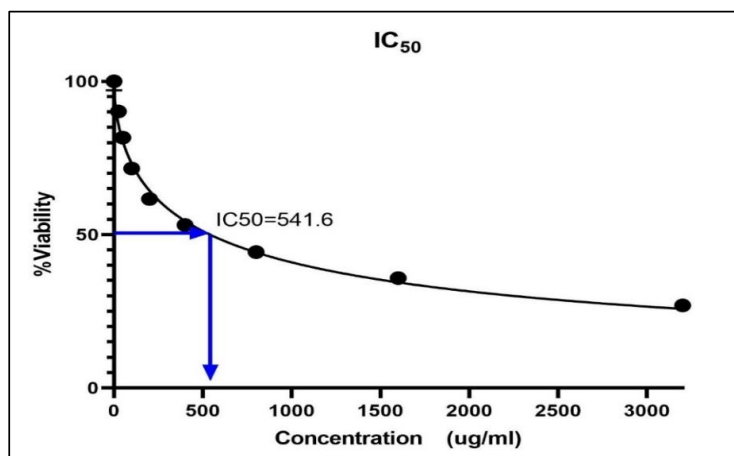
$$\Delta CT_{\text{non-treat}} = CT_{\text{gene-non-treat}} - CT_{\text{housekeeping-non-treat}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{treat}} - \Delta CT_{\text{non-treat}}$$

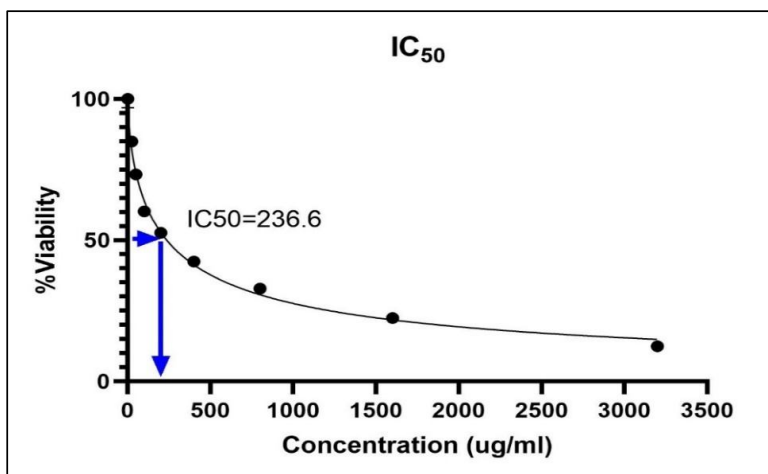
$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از این آزمایش ابتدا

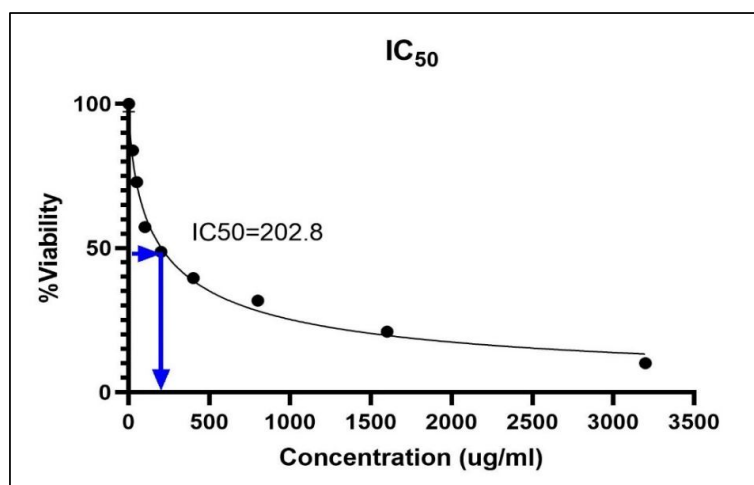
در نرم‌افزار اکسل وارد و کدگذاری و ویرایش شدند. با استفاده از نرم‌افزار *SPSS* و با استفاده از آزمون مربع کای و آزمون *ANOVA*



نمودار (۱): غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (IC_{50}) لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی رده سلولی ACHN طی ۲۴ ساعت



نمودار (۲): غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (IC_{50}) لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی رده سلولی ACHN طی ۴۸ ساعت

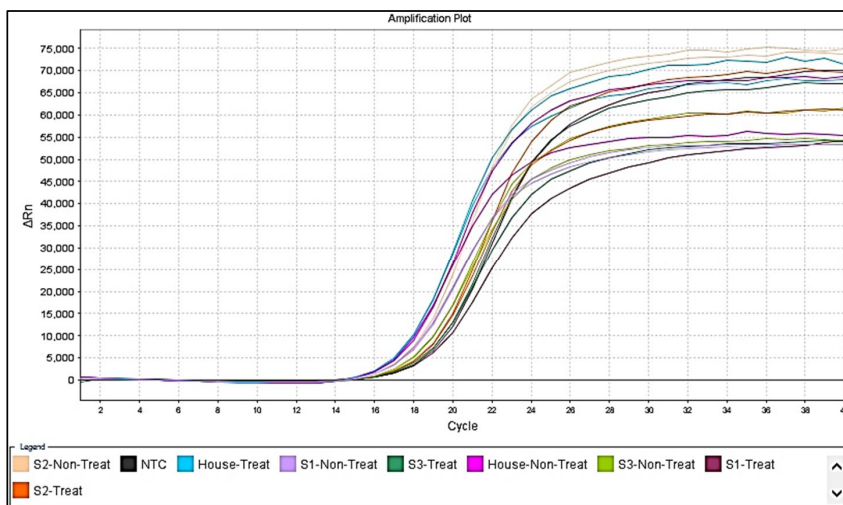


نمودار (۳): غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (IC_{50}) لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی رده سلولی ACHN طی ۷۲ ساعت

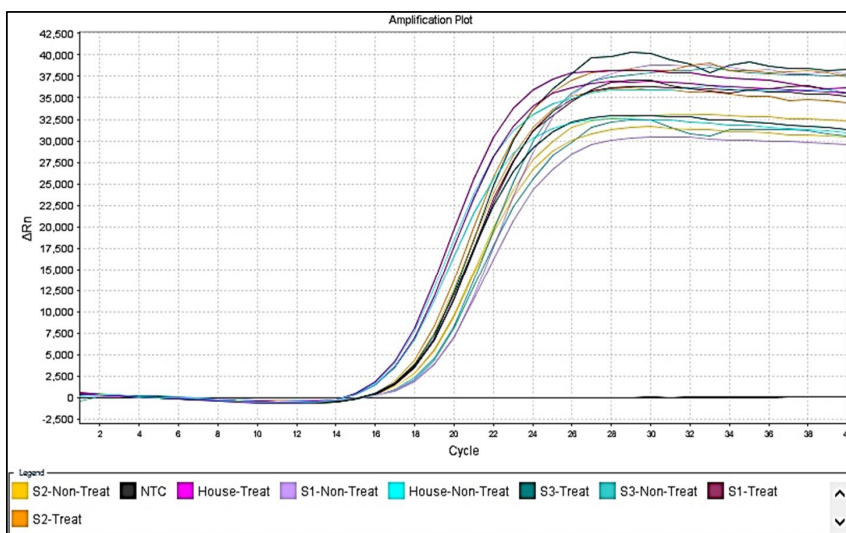
نشانهگر فلورسنت در روش *Real-Time PCR* می‌توان میزان تکثیر ژن مورد مطالعه را بررسی نمود. در نمودار ۴ و ۵ منحنی تکثیر ژن‌های ذکر شده بر اساس سیکل‌های واکنش *Real-Time* در دسترس می‌باشد.

بررسی میزان بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* با تکنیک *Real-Time PCR*

بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* رده سلولی سرطان کلیه بعد و قبل از تیمار با لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس، با استفاده از *Real-Time PCR* مورد بررسی قرار گرفت. از طریق به کارگیری



نمودار (۴): منحنی تکثیر واکنش *Real-Time* مربوط به ژن *bcl-2* قبل و بعد از تیمار با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس



نمودار (۵): منحنی تکثیر واکنش *Real-Time* مربوط به ژن *bax* قبل و بعد از تیمار با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس

و بیان نسبی محاسبه گردید. نتایج مربوط به آنالیز آماری آزمون *Real-Time PCR* برای ژن‌های *bax* و *bcl-2* در جدول ۲ و ۳ و نمودار بیان نسبی ۶ و ۷ آورده شده است.

نتایج آنالیز آزمون *Real-Time PCR*

به‌منظور آنالیز داده‌های این آزمون از نرم‌افزار اکسل استفاده گردید و بر اساس CT های موجود با روش $\Delta\Delta CT$ Fold change

جدول (۲): نتایج آنالیز آماری مربوط به تأثیر لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس بر بیان ژن bcl-2

House (GAPDH)			
Name	CT	CT	Average CT
Treat	17.75	17.71	17.73
Non-Treat	17.92	17.81	17.865
Gene (bcl-2)			
Name	CT	CT	Average (CT)
Sample 1 Treat	19.71	19.79	19.75
Sample 2 Treat	19.42	19.48	19.45
Sample 3 Treat	19.58	19.51	19.545
Sample 1 Non-Treat	18.55	18.51	18.53
Sample 2 Non-Treat	18.48	18.48	18.48
Sample 3 Non-Treat	18.86	18.91	18.885
ΔΔCT Method			
Name	ΔCT	ΔΔCT	Fold change
Sample 1 Treat	2.02	1.355	0.390934822
Sample 2 Treat	1.72	1.105	0.464902471
Sample 3 Treat	1.815	0.795	0.576343173
Sample 1 Non-Treat	0.665	-0.101666667	-
Sample 2 Non-Treat	0.615	-0.151666667	-
Sample 3 Non-Treat	1.02	0.253333333	-
Avg Fold change	0.4773935		
T-Test			
P-value	Significant or Not		
0.007232121	Significant		

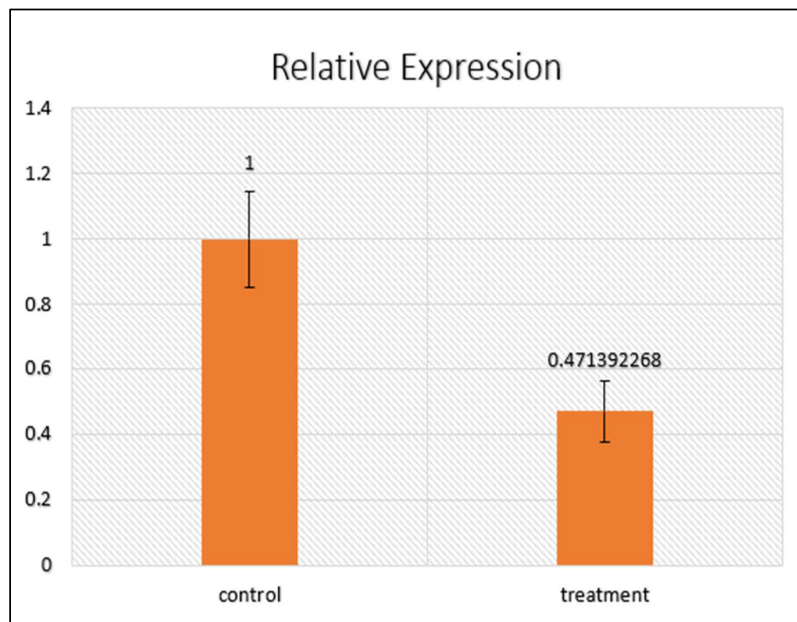
جدول (۳): نتایج آنالیز آماری مربوط به تأثیر لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس بر بیان ژن bax

House (GAPDH)			
Name	CT	CT	Average CT
Treat	17.24	17.48	17.36
Non-Treat	17.52	17.28	17.40
Gene (bax)			
Name	CT	CT	Average (CT)
Sample 1 Treat	18.71	18.72	18.715
Sample 2 Treat	18.39	18.36	18.375
Sample 3 Treat	18.65	18.62	18.635
Sample 1 Non-Treat	19.51	19.53	19.52
Sample 2 Non-Treat	19.01	19.05	19.03

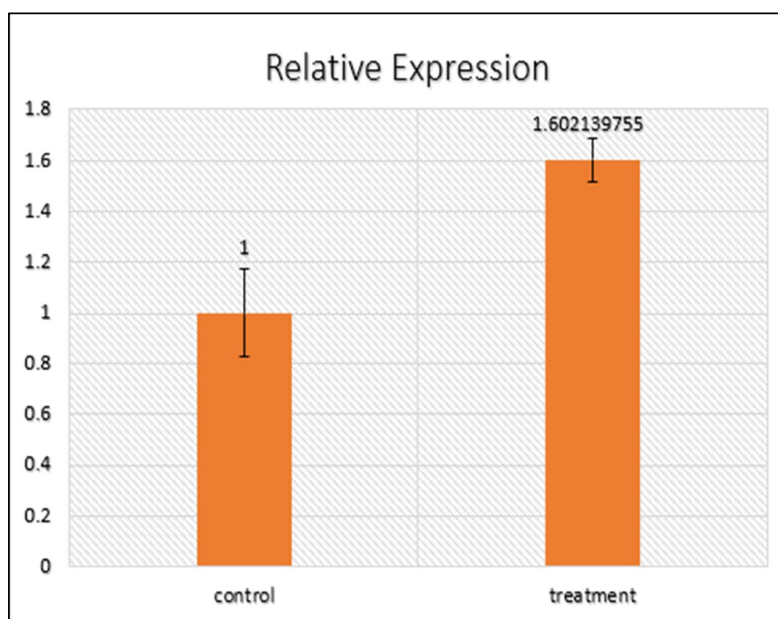
Sample 3 Non-Treat	19.31	19.36	19.335
ΔΔCT Method			
Name	ΔCT	ΔΔCT	Fold change
Sample 1 Treat	1.355	-0.765	1.699369998
Sample 2 Treat	1.015	-0.615	1.531557997
Sample 3 Treat	1.275	-0.66	1.580082624
Sample 1 Non-Treat	2.12	0.225	-
Sample 2 Non-Treat	1.63	-0.265	-
Sample 3 Non-Treat	1.935	0.04	-
Avg Fold change	1.6036702		
T-Test			
P-value	Significant or Not		
0.032166818	Significant		

با توجه به آنالیزهای به دست آمده و مطابق نمودار ۷، بیان ژن *bax* در سلول سرطانی تیمار شده با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته است که نشان‌دهنده تأثیر بالای این سوپرناتانت در افزایش بیان ژن *bax* می‌باشد. در تمامی موارد میزان *P-value* در آزمون *T-test* کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان از معنادار بودن این افزایش بیان می‌باشد.

با توجه به آنالیزهای به دست آمده و مطابق نمودار ۶، بیان ژن *bcl-2* در سلول سرطانی تیمار شده با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشته است که نشان‌دهنده تأثیر بالای این سوپرناتانت در کاهش بیان ژن *bcl-2* می‌باشد. در تمامی موارد میزان *P-value* در آزمون *T-test* کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان از معنادار بودن این کاهش بیان است.



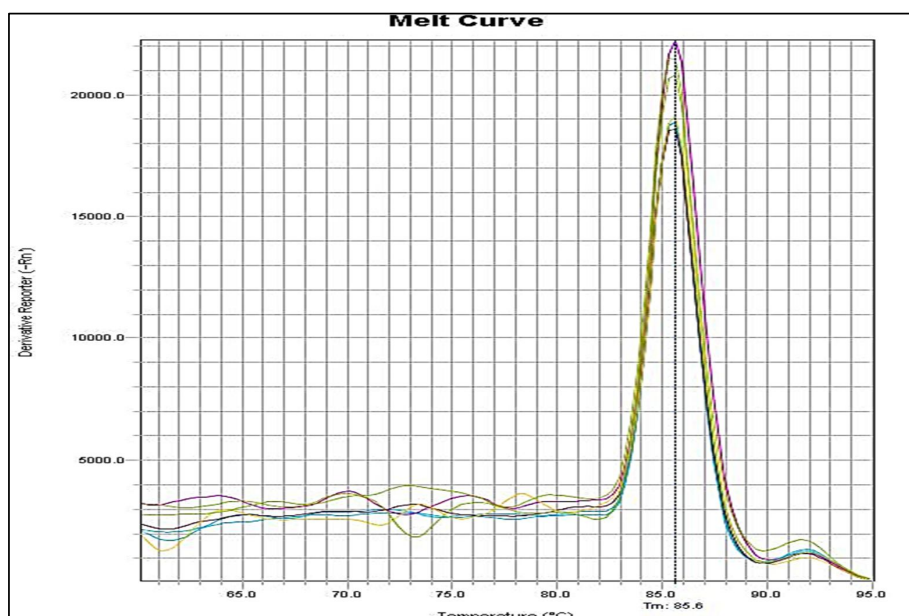
نمودار (۶): بیان نسبی ژن *bcl-2* در حالت تیمار با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس



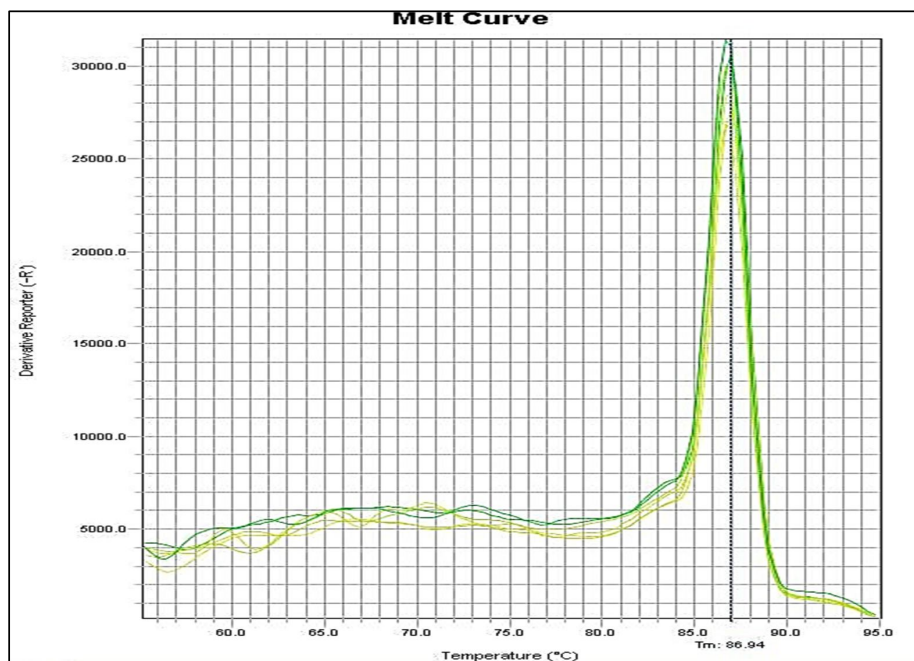
نمودار (۷): بیان نسبی ژن *bax* در حالت تیمار با لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس

Real-Time از منحنی ذوب استفاده شد که در نمودار ۸ و ۹ آورده شده است. همان طور که در نمودارهای مربوط به ژنهای *bcl-2* و *bax* آمده است، نتایج مورد تأیید می‌باشد و تمام واکنش‌ها به ترتیب در دمای ۸۵/۶ و ۸۶/۹۴ یک قله تشکیل داده‌اند.

بررسی منحنی ذوب و منحنی استاندارد: هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود در واکنش *Real-Time* می‌باشد؛ بنابراین تمام منحنی‌های یک ژن در تمام نمونه‌ها باید با هم منطبق باشند و تمام منحنی‌ها تک قله باشند، در غیر این صورت نتایج قابل پذیرش نمی‌باشند. به‌منظور اطمینان از صحت انجام کار واکنش



نمودار (۸): منحنی ذوب واکنش *Real-Time* برای ژن *bcl-2*



نمودار (۹): منحنی ذوب واکنش *Real-Time* برای ژن *bax*

بر روی رده سلولی سرطانی *SW480* و سطح بیان ژن سیکلین *DI* در سلول‌های سرطانی تیمار شده بررسی شد. نتایج نشان داد که سرعت رشد سلول‌های سرطانی تیمار شده با نایسین در مقایسه با سلول‌های سرطانی تیمار شده با دو ماده دیگر به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p < 0.05$). میزان بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده با نایسین در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم، عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی به ترتیب ۳۴، ۴۷ و ۴۹ درصد بود.

نتایج *Real-time PCR* نشان داد که بیان *mRNA* سیکلین *DI* به‌طور قابل‌توجهی در سلول‌های *SW480* تیمار شده با نایسین کاهش یافته است ($p < 0.05$). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نایسین، عصاره سیتوپلاسمی باکتری و دیواره سلولی باکتری دارای اثرات ضد تکثیری هستند که با کاهش بیان سیکلین *DI* در رده سلولی *SW480* همراه است (۱۴).

با توجه به یافته‌های این پژوهش، میزان بقای سلول‌های سرطانی کلیه تیمار شده با سوپرناتانت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین نتایج *Real-time PCR* نشان داد که بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* در سلول‌های سرطانی کلیه تیمار شده با سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس نسبت به گروه کنترل به ترتیب کاهش و افزایش یافت.

در مطالعه کریمایی و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که بررسی‌های سمیت سلولی در تحقیق ما نشان داد که با *IC50* معادل

جهت سنجش میزان مطلق ژن هدف در نمونه‌ها، منحنی استاندارد با استفاده از داده‌های واکنش *Real-Time* ترسیم شد. راندمان واکنش *PCR* در این بررسی برای ژن‌های *bcl-2* و *bax* به ترتیب ۸۴/۵۶۱۶۶ و ۸۷/۱۶۶۱۷ درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تست *MTT* حاکی از این بود که اثر سایتوتوکسیک لیزرات استخراج‌شده از لاکتوکوکوس لاکتیس به غلظت آن و گذر زمان بستگی دارد؛ بنابراین، با افزایش غلظت و زمان، میزان مرگ سلولی افزایش یافت. مقدار غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (*IC50*) برای متابولیت لاکتوکوکوس لاکتیس پس از گذر ۷۲ ساعت ۲۰۲/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر محاسبه شد.

در مطالعه حاضر، کاهش ۵۲/۸۶ درصدی بیان ژن *bcl-2* در سلول‌های سرطانی کلیه تیمار شده با سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس نسبت به گروه کنترل، نشان از تأثیر مهم این سوپرناتانت در کاهش بیان ژن *bcl-2* است. همچنین، افزایش ۶۰/۲۱ درصدی بیان ژن *bax* در سلول‌های سرطانی کلیه تیمار شده نسبت به گروه کنترل، نشان از تأثیر بالای این سوپرناتانت در افزایش بیان ژن *bax* است.

در مطالعه ساره سادات حسینی و همکاران، اثر ضد تکثیری دیواره سلولی، عصاره سیتوپلاسمی لاکتوکوکوس لاکتیس و نایسین

سلول‌های *HK-2* ناشی از ملتین، سطح بیان *Bax* به‌طور قابل توجهی افزایش و *Bcl-2* به‌طور قابل توجهی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری

ضد میکروبی، نایسین (محصول ژن *nisa*)، این باکتریوسین با ۳۴ آمینواسید تولیدشده توسط چندین سویه از لاکتوکوکوس لاکتیس همچون می‌تواند به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در مواد غذایی استفاده شود. ژن‌های سیستم انتقال سیگنال دوجزئی، *nisK* و *nisR* از خوشه ژنی نایسین، به کروموزوم لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کریموریس *MG1363* (نایسین منفی) وارد شدند. اثر نایسین بر آپوپتوز و متاستاز سلول‌های کارسینوم مثانه انسانی و کارسینومای کلیه (*ACHN*) مشاهده شد. بیشترین میزان سمیت سلولی زمانی مشاهده شده است که سلول‌ها در معرض بالاترین دوز نایسین قرار گرفتند. در سلول‌های سرطانی بیان ژن‌های *bax*، *bcl-2* با قرارگرفتن در معرض نایسین به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. بنابراین، نتایج مطالعه نشان داد که فاکتورهای تنظیم‌کننده آپوپتوز *bax* و *bcl-2* نقش کلیدی در تنظیم آپوپتوز *RTECs* ناشی از ملتین دارند و مرجع نظری برای یافتن اهداف جدید برای پیشگیری و درمان آسیب حاد کلیه *AKI* است.

تشکر و قدردانی:

از تمامی افرادی که در این مطالعه همکاری داشته‌اند، در این قسمت قدردانی و سپاسگزاری ویژه می‌گردد. این مقاله حاصل (بخشی از) طرح تحقیقاتی پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "تأثیر لیزات پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس (*NIS+*) بر بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* ضد آپوپتوز رده سلولی سرطان کلیه" مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه است.

تضاد منافع:

بین نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارد.

حمایت مالی تحقیق:

برای انجام این پژوهش تحقیقی هیچ حمایت مالی از فرد یا سازمان یا دانشگاهی دریافت نشده است.

ملاحظات اخلاقی:

این تحقیق مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه با کد اخلاق IR.IAU.ARAK.REC.1403.165 است.

۲۰۲/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس پس از گذر ۷۲ ساعت قادر به سرکوب تکثیر سلول‌های سرطانی کلیه (*ACHN*) بود. بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* گویای کاهش ۵۲/۸۶ درصدی بیان ژن *bcl-2* و افزایش ۶۰/۲۱ درصدی بیان ژن *bax* در سلول‌های سرطانی کلیه تیمار شده با سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس نسبت به گروه کنترل است (۱۳).

YUSI ERA و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که هدف اصلی تعیین فعالیت ضد تکثیری عصاره باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس در مقابل سلول‌های سرطانی ریه *HTB-179* بود. نتایج نشان داد که عصاره خام لاکتوکوکوس لاکتیس دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی ریه *HTB-179* با *IC50* معادل ۲۷/۱۹۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، و با توجه به داده‌های تحقیق حال حاضر، تجزیه‌وتحلیل آماری سنجش *MTT* نشان داد که میزان بقای سلولی در سلول‌های سرطانی تیمار شده، با گذر زمان و افزایش غلظت سوپرناتانت بدون سلول لاکتوکوکوس لاکتیس به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. مقدار غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (*IC50*) برای لیزات لاکتوکوکوس لاکتیس با گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۵۴۱/۶، ۲۳۶/۶ و ۲۰۲/۸ میکروگرم/میلی‌لیتر گزارش شد (۲۱).

خانواده *BCL-2* نقش کلیدی در تنظیم مسیر آپوپتوز میتوکندری ایفا می‌کند (*M. O. Hengartner*)، و شامل اعضای بسیاری مانند *Bcl-2*، *Bcl-xl*، *Bcl-w*، *Mcl-1*، *AI*، *Bax* (*Bcl*) می‌شود. با توجه به نقش ژن‌ها در آپوپتوز، می‌توان آن‌ها را به انواعی از عوامل پروآپوپتوز و عامل ضدآپوپتوز اشاره کرد. در میان آن‌ها، *Bax/Bcl-2* یک جفت تنظیم‌کننده آپوپتوز رایج و مهم هستند. بنابراین با انجام مطالعه‌های بیشتر می‌توان از باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس به‌عنوان یک محصول پروبیوتیک ضد سرطان در درمان از سرطان کلیه استفاده نمود. این نتایج می‌توانند به بهبود درک تأثیرات پروبیوتیک‌ها بر سلول‌های سرطانی و توسعه روش‌های نوین در درمان و پیشگیری از سرطان کمک کنند (۲۵-۲۲). محدودیت‌های تحقیق در این پژوهش می‌تواند به محدودیت‌هایی مانند استفاده از مدل‌های سلولی به‌جای مدل‌های حیوانی یا انسانی اشاره کرد.

در مطالعات آزمایشگاهی از طریق *RT-PCR*، سنجش‌های وسترن بلات، و تشخیص لکه‌های *IF* بیشتر تأیید شد که در آپوپتوز

References

1. Frelet-Barrand A. Lactococcus lactis, an attractive cell factory for the expression of functional

membrane proteins. *Biomol* 2022;12(2):180
<https://doi.org/10.3390/biom12020180>

- 2 .Singh VP. Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open Vet J* 2018;8(1):104-11 <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- 3 .Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, Akbary N. *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol* 2017;9(4):163
- 4 .Van Gijtenbeek LA, Robinson A, Van Oijen AM, Poolman B, Kok J. On the spatial organization of mRNA, plasmids, and ribosomes in a bacterial host overexpressing membrane proteins. *PLoS Genet* 2016;12(12):e1006523 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006523>
- 5 .Karimaei S, Mashhadi R, Mirzaei A, Deyhimfar R, Shabestari AN, Rahimnia R. Antibacterial and antibiofilm activities of nisin from *Lactococcus lactis* and alteration of the bacteria-induced pro-inflammatory responses on kidney and bladder tumor cell lines. *Transl Res Urol* 2022;4(1):47-53
- 6 .Abdul-Kaliq MT, Rasool KH, Essa RH. Effect of Crude Bacteriocin Isolated from Locally *Lactococcus lactis* on Cancer Cell Lines. *Indian J Forensic Med Toxicol* 2020;14(1):281-8
- 7 .Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol* 2022;12:985363 <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- 8 .Park H-A, Broman K, Jonas EA. Oxidative stress battles neuronal Bcl-xL in a fight to the death. *Neural Regen Res* 2021;16(1):12-5 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.286946>
- 9 .Campbell KJ, Tait SW. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018;8(5):180002 <https://doi.org/10.1098/rsob.180002>
- 10 .Jeng PS, Inoue-Yamauchi A, Hsieh JJ, Cheng EH. BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis. *Curr Opin Physiol* 2018;3:71-81 <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.005>
- 11 .Lee H-Y, Oh S-H. Autophagy-mediated cytoplasmic accumulation of p53 leads to apoptosis through DRAM-BAX in cadmium-exposed human proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;534:128-33 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.019>
- 12 .Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, Jakubowski C, Chen Y-B, Dong Y, et al. Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nat Commun* 2017;8(1):1-10 <https://doi.org/10.1038/ncomms15165>
- 13 .Karimaei S, Shabestari AN, Mirzaei A, Fatahi B. Apoptosis, cytotoxicity and expression of metastatic suppressor genes increased in human bladder and renal carcinoma cells by Nisin. *Transl Res Urol* 2022;4(2):83-8
- 14 .Hosseini SS, Goudarzi H, Ghalavand Z, Hajikhani B, Rafeiciatani Z, Hakemi-Vala M. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of *Lactococcus lactis* and nisin through down-regulation of cyclin D1 on SW480 colorectal cancer cell line. *Iran J Microbiol* 2020;12(5):424 <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i5.4603>
- 15 .Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe* 2014;30:51-9 <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.009>
- 16 .Wu G, Yang Q, Long M, Guo L, Li B, Meng Y, et al. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. *J Antibiot* 2015;68(11):661-5 <https://doi.org/10.1038/ja.2015.51>
- 17 .Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell*

- culture: methods and Protoc 2011:237-45
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- 18 .Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in vitro hepatocyte research* 2015:333-48 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26
- 19 .Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols* 2018;2018(6):pdb.prot095505
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- 20 .Ghatei N, Nabavi AS, Toosi MHB, Azimian H, Homayoun M, Targhi RG, et al. Evaluation of bax, bcl-2, p21 and p53 genes expression variations on cerebellum of BALB/c mice before and after birth under mobile phone radiation exposure. *Iran J Basic Med Sci* 2017;20(9):1037
- 21 .ERA Y. Uji Aktivitas. Antiproliferasi Senyawa Ekstrak *Lactococcus lactis* Terhadap Cell Line. Kanker Paru HTB-179 Secara In Vitro: Universitas Muhammadiyah Yogyakarta; 2022
- 22 .Shu Y, Yang Y, Zhao Y, Ma L, Fu P, Wei T, et al. Melittin Inducing the Apoptosis of Renal Tubule Epithelial Cells through Upregulation of Bax/Bcl-2 Expression and Activation of TNF- α Signaling Pathway. *Biomed Res Int* 2019;2019(1):9450368
<https://doi.org/10.1155/2019/9450368>
- 23 .Goodarzi M, Fazeli, Sepahi A, Abbas, Eidi, Akram. Investigation of the antiviral properties of *Lactobacillus rhamnosus* on herpes simplex virus type 2. *J Med Sci Stud* 2021;32(7):478-89
<https://doi.org/10.52547/umj.32.7.478>
- 24 .Sayadi, Mehran, Tajik. Evaluation of the efficacy of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* in detoxifying aflatoxin B1 based on a simulated model of gastrointestinal secretions. *J Med Sci Stud* 2018;29(4):270-81
25. Hajari Taheri F, Mahdavi M, Shokrgozar M, Bayat M, Yazdi M, Abolhassani M. Study of protective effect of *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus casei* in reducing the *candida albicans* infection in BALB/C MICE. *J Urmia Univ Med Sci* 2013; 23 (7): 784-91.

THE EFFECT OF *LACTOCOCCUS LACTIS* (+NIS) PROBIOTIC LYSATE ON THE EXPRESSION OF ANTI-APOPTOTIC *BAX* AND *BCL-2* GENES IN KIDNEY CANCER CELL LINE

Kumarss Amini*¹, Hamed Azadifar²

Received: 13 November, 2024; Accepted: 25 December, 2024

Abstract

Background & Aims: Today, *Lactococcus lactis* bacteria play a key role as a probiotic in the treatment and prevention of cancer. Additionally, bacteriocins-producing strains of *Lactococcus lactis* are able to inhibit the growth of a wide range of bacteria, especially antibiotic-resistant strains. The aim of the present study was to investigate the effects of probiotic lysate of *Lactococcus lactis* (+NIS) on the expression of anti-apoptotic genes in renal cancer cell lines.

Materials and Methods: After isolating and examining 60 strains of *Proteus mirabilis* through diagnostic and biochemical tests, Multiplex PCR was performed to identify anti-apoptotic genes in renal cancer cell lines. After culturing and preparing the supernatant of nisin-producing *Lactococcus lactis* (PTCC1336), its activity was examined by plating on agar. Using Real-Time PCR, the expression of *AcrB* gene in *Proteus mirabilis* strains treated with supernatant was examined.

Results: After the cytotoxicity studies of this supernatant, the relative expression of *bcl-2* and *bax* genes in kidney cancer cells was studied. Nisin prepared for *Proteus mirabilis* strains had a slight inhibitory effect due to its mobility and virulence factors. MTT assay analysis showed that the cell survival rate in treated cancer cells decreased significantly with the passage of time and increased concentration of *Lactococcus lactis* cell-free supernatant. Among the 60 *Proteus mirabilis* samples, 37 samples had the *AcrA* gene, 59 samples had the *AcrB* gene, and 58 samples had the *Urea* gene. According to the analysis of MTT test data, the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for this supernatant was calculated to be 202.8 µg/ml after 72 hours.

Discussion: The results showed a 52.86% decrease in *bcl-2* gene expression and a 60.21% increase in *bax* gene expression in treated cancer cells compared to the control group. Cytotoxicity studies in this research showed that with an IC₅₀ of 202.8 µg/ml, the supernatant was able to suppress the proliferation of renal cell carcinoma (ACHN). The study demonstrated that probiotic lysate *Lactococcus lactis* (+NIS) affected genes related to apoptosis in renal cancer cells. These lysates were able to reduce *bcl-2* gene expression and increase *bax* gene expression, indicating the induction of apoptosis in cancer cells.

Keywords: *Proteus mirabilis*, *Lactococcus lactis*, Nisin, Kidney cancer, Probiotic

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Tel: +989184366284

Email: DR_Kumarss_Amini@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(8): 694 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran (Corresponding Author)

² Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran