

تأثیر پروبیوتیک‌های بومی بر بیان ژن‌های ضد سرطانی Real Time PCR سلولی سرطانی HT-29 با روش *bax/bcl2*

آیدا پورخراسانی^۱، نوشین خندان دزفولی^۲، مهسا فرقانی^۳، احسان استبرقی^۴، کیومرث امینی^۵

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم در انسان است. پروبیوتیک‌ها بر تعادل باکتری‌های مفید و مضر روده تأثیر می‌گذارد و این تعادل را به نفع افزایش جمعیت باکتری‌های مفید و ایجاد اثرات سلامت بخش تغییر می‌دهند. لذا هدف از مطالعه پیش رو؛ تأثیر پروبیوتیک‌های بومی بر بیان ژن‌های ضد سرطانی *bax* و *bcl2* باید سلولی سرطانی HT-29 با روش Real Time PCR است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از کشت سلول‌های سرطانی HT-29 و تیمار آن با عصاره پروبیوتیکی استخراج RNA و سنتز cDNA انجام می‌گردد. آزمون Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص ژن‌های ضد سرطانی *bax* و *bcl2* در دستگاه corbet انجام گردید. همچنین آزمون MTT به‌منظور بررسی توکسیسیته عصاره پروبیوتیک بومی انجام گردید.

یافته‌ها: آزمون نشان داد که افزایش غلظت عصاره مورد مطالعه باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز می‌شوند. مقادیر IC50 برای عصاره پروبیوتیکی ۳۰۰ ug/ml محاسبه شد. همچنین میزان ژن‌های *bax* و *bcl2* در سلول‌های تحت تیمار با سوپرناتانت عاری از سلول لاکتوکوکوس رامنوسوس برابر ۱/۳۴۴ و ۱/۴۴۷ بود که نشان می‌دهد افزایش بیان این دو ژن است. (میزان بیان ژن *bax* به مقدار ۱/۳۴۴ برابر و میزان بیان ژن *bcl2* به مقدار ۱/۴۴۷ برابر در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$)).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به سمیت کم عصاره پروبیوتیک در تست MTT و افزایش بیان ژن‌های *bax* و *bcl2*، به نظر می‌رسد می‌توان از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های درمانی در پیشگیری و درمان سرطان‌های گوارشی استفاده کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌های بومی می‌توانند به‌عنوان یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا و عوارض جانبی کم برای درمان و پیشگیری از سرطان کولون مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: عصاره پروبیوتیک، بیان ژن، سرطان کولون، MTT assay، Real-Time PCR

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره نهم، ص ۷۵۵-۷۶۶، آذر ۱۴۰۳

Email: nooshinkhandan22@gmail.com

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۸۵۵۵

مقدمه

اثر پروبیوتیک‌های بومی بر تنظیم بیان ژن‌های *bax* و *bcl2* در سلول‌های سرطانی HT-29 وجود دارد. سرطان روده بزرگ نیز به‌عنوان سومین سرطان شایع در جهان دارای اهمیت فراوانی است (۲). تغییرات میکروبیوتای روده در بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ در مطالعات بسیاری گزارش شده‌اند (۳). پروبیوتیک‌های تجاری مبتنی بر سوش‌های باکتریایی با ایجاد تغییرات ژنومی و

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است. بر اساس پیش‌بینی‌های سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۳۰، بیش از ۲۱ میلیون مورد جدید سرطان و بیش از ۱۳ میلیون مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان اتفاق می‌افتد (۱). باوجود مطالعات متعدد در زمینه اثرات پروبیوتیک‌ها بر سرطان، اطلاعات محدودی درباره

^۱ کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشجوی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، گروه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴ گروه میکروبیولوژی، واحد شهرپاک، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرپاک، ایران

^۵ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

مهندسی ژنتیک و بدون عوارض جانبی بوده و مورد تأیید سازمان غذایی و دارویی جهانی بوده و سبب کارایی بیشتر و مؤثرتر خواهند شد در حالیکه پروبیوتیک‌های بومی در محل زیست خود (میکروبیوم روده) در منطقه با سازگاری اکولوژیکی و جدا از تغییرات ژنومی، در محیط با شرایط یکنواخت و ثابت با قدرت و توانایی در زمینه‌های مورد نیاز همان منطقه زیستی را تقویت و مورد استفاده قرار داده‌اند. باکتری‌های پروبیوتیک، نقش مهمی در کاهش ابتلا به سرطان کولون و درمان سرطان کولون را می‌توانند ایفا می‌کنند (۴). می‌توان با استفاده از سابقه ژنتیکی بیماران نسبت به پیش‌آگهی آن‌ها در افراد با سابقه ژنتیکی میزان بقای افراد در معرض ابتلا با تشخیص زودهنگام بیماری افزایش داد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب لوسیوم‌ها و ترکیبات الفاکاننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند (۴).

پروتئین *BAX* به‌عنوان پروتئین کلیدی در آپوپتوز القاشده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل کرده و *BCL2* یک اثر آنتی آپوپتوتیک در پاسخ به محرک‌های مختلف آپوپتوز از طریق جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری دارد (۵). ژن‌های *bax* و *bcl2* ازجمله ژن‌های مهم دخیل در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به شمار می‌روند. از آنجاکه در سلول‌های سرطانی تعادل بین تکثیر و آپوپتوز به هم‌خورده و سلول‌ها برای رشد و تکثیر بی‌رویه خود نیاز به مهار آپوپتوز دارند، ارتباط مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و فرایند سرطانی شدن وجود دارد (۶).

بنابراین بررسی تغییرهای بیانی این ژن‌ها می‌تواند ازجمله هدف‌های درمانی یا تشخیصی در مطالعه‌های سرطان به شمار می‌رود. از این‌رو در این مطالعه تغییرهای بیانی ژن‌های *bax* و *bcl2* در سلول‌های سرطانی و همچنین وجود ارتباط معنادار میان این تغییرها و پارامترهای مختلف بیماری ازجمله سن و جنس بیماران، مرحله بیماری، وضعیت تمایز یافتگی، اندازه و مکان تومور اولیه بررسی می‌گردد (۶). *bax* یک ژن پروآپوپتوزی است که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌شود و پروتئین *Bax* سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها می‌شود. در شرایط عادی پروتئین *Bax* عمدتاً از طریق انتقال مجدد از میتوکندری به سیتوزول به‌وسیله *BCL2L1 / Bcl-xL* به‌طور سیتواسال در بدن وجود دارد و از انباشت سطح *Bax* سمی در غشای بیرونی میتوکندری جلوگیری می‌کند. تحت شرایط استرس، یک تغییر سازگاری رخ می‌دهد که باعث انتقال به غشای میتوکندریایی می‌شود که منجر به آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود که پس از آن باعث آپوپتوز می‌شود

(۷). پروبیوتیک‌ها در درمان اسهال ناشی از باکتری‌های پاتوژن روده‌ای مانند سندرم روده تحریک‌پذیر و سرطان‌های کولون نقش دارند (۸). نوع اثر پروبیوتیک، به تولید متابولیت‌های فعال از نظر بیوشیمیایی آن‌ها یا مولکول‌های موجود بر سطح این میکروارگانیسم‌ها یا اجزای مترشحه از آن‌ها بستگی دارد (۹). به‌طور کلی، پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی شامل اسید چرب با زنجیره کوتاه مثل استات، لاکتات، سوکسینات، بوتیرات، H_2O_2 و ترکیب‌های باکتریوسین تولید می‌کنند که هم روی باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر می‌گذارند و با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات مفیدی را بر روی سلامت میزبان اعمال می‌کنند و عموماً از منابع انسانی بوده و غیر بیماری‌زا محسوب می‌شوند (۱۰). مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها کاملاً شناخته‌شده نیست، ولی مکانیسم‌هایی برای توجیه اثرات پیشگیری‌کننده و درمانی آن‌ها در بیماری‌های انسان پیشنهاد شده است (۱۱). هدف از مطالعه حاضر تأثیر پروبیوتیک‌های بومی بر بیان ژن‌های ضد سرطانی *bax/bcl2* سلولی سرطانی HT-29 با روش Real time PCR است.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه پروبیوتیک و رده سلولی HT-29

در این مطالعه سویه پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس از کلکسیون میکروبی انستیتوپاستور تهران با کد ATCC 53103 به‌صورت لئوفیلزیه تهیه گردید. جهت آماده‌سازی باکتری کشته‌شده با حرارت، ابتدا باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط کشت MRS broth به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به دنبال آن از سوسپانسیون با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه رسوب تهیه شد و مایع رویی جدا شد. رسوب تهیه‌شده چندین بار با PBS شستشو داده شد و غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. رده سلولی سرطان کلون انسان (HT-29 cell line) از انستیتوپاستور ایران با کد NCBI C135 خریداری گردید. ابتدا سلول‌های در محیط کشت RPMI1640 (Biosera; USA) غنی‌شده با ۱ v/v پنی سیلین-استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گاو (fetal bovine serum) (FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ رطوبت قرار داده شد.

سنجش تست MTT سویه پروبیوتیک بر روی رده

سلولی HT-29

به‌منظور بررسی اثرات کشندگی عصاره سلول باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی رده سلولی HT-29 از روش رنگ

سلول‌های HT-29 پس از تیمار، از کیت (QIAGEN) QuantiFast SYBR Green و دستگاه Real time PCR (QIAGEN-آمریکا) استفاده شد. در این مطالعه برای بررسی مقایسه‌ای ژن‌های مذکور با ژن خانگی GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (House keeping) استفاده شد. جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده در مطالعه حاضر را نشان می‌دهد (۱۳، ۱۴).

واکنش Real time PCR به‌صورت دوتایی (Duplicate) با بکارگیری cDNA های سنتز شده و سایبرگرین انجام شد. در این مرحله هر کدام از میکروتیوپ‌ها با ۲۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ μM پرایمرها با ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت RealQ plus حاوی سایبرگرین آماده شد. دما و شرایط Real time PCR به‌صورت زیر بود: گرمادهی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه که طی این مرحله Taq پلیمرز (Hot start Taq polymerase) فعال می‌شود. در هر چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود که طی ۴۰ چرخه ادامه داشت (۱۳، ۱۴).

با استفاده از سایبرگرین^۱ میزان آمپلی فیکاسیون^۲ در هر چرخه دنبال شد. رنگ سایبر گرین با اتصال به DNA دو رشته‌ای علامت فلورسانت ساطع می‌کند (۱۵). در چرخه‌ای که واکنش تکثیر وارد مرحله لگاریتمی می‌شود، که تحت عنوان Ct^۳ گفته می‌شود میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود. بررسی معنی‌دار بودن نتایج توسط آزمون T-test انجام شد. آزمایش‌ها برای هر کدام از تیمارهای زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت حداقل سه بار تکرار شدند و در شکل ۱ نمونه‌ای از منحنی‌های Real time PCR آورده شده است. P-value ذکر شده از مقایسه میانگین و انحراف معیار ژن‌های *bax* و *bcl2* در مقایسه با گروه کنترل و همچنین مقایسه میانگین و انحراف معیار ژن *bax* با میانگین و انحراف معیار ژن *bcl2* (با *bax/bcl2*) با ۳ بار تکرار به دست آمده است. میزان بیان ژن از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ Target gene} - Ct \text{ Reference gene})$$

$$\Delta Ct (\text{Treatment}) = (Ct \text{ Target gene} - Ct \text{ Reference gene})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ treatment} - \Delta Ct \text{ Control})$$

$$\text{Relative fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

یافته‌ها

کشت سلول‌های HT-29 بعد از رشد و تمایز سلول‌ها تحت تیمار با عصاره پروبیوتیکی در شکل ۱ نشان داده شده است. از تست

سنجی MTT (Microculture Tetrazolium Test) (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره سلول باکتری کشته‌شده با حرارت در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT-29 تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به‌دقت خارج شد و به آن رنگ MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط ۵٪ CO₂ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولیدشده به‌وسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد: ۱۰۰×(جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول‌های

تیمار شده) = میزان بقای سلولی

همچنین میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (Half IC50 maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد (۱۲).

ارزیابی بیان ژن‌های *bax* و *bcl2* با روش Real Time PCR

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *bax* و *bcl2* با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. استخراج RNA از کل سلول‌های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (RNX-Plus). سیناژن انجام شد. رسوب سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus (CinnaGen) اضافه شد و مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند.

سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به‌آرامی برداشته شد و هم‌حجم آن ایزوپروپانول (Merck آلمان) اضافه و کاملاً مخلوط و سپس در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در انتها رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل شد. برای این روش مولکولی از محلول MTC فاقد ماده ژنتیکی (RNA) به‌عنوان کنترل منفی و از مخلوط GAPDH به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density: OD) توسط فتومتر (Eppendorf – آلمان) انجام شد. یک میکروگرم از RNA استخراج‌شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Bioneer، کره جنوبی) به کار رفت. به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *bax* و *bcl2* در

³ Threshold cycle

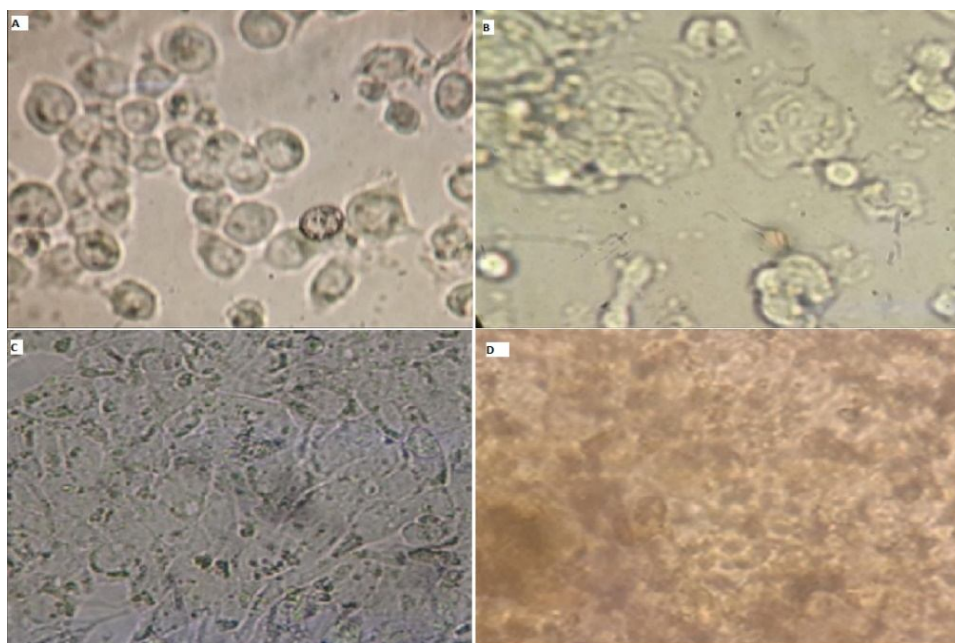
¹ Syber green

² Amplification

MTT assay برای اندازه‌گیری سمیت سلولی عصاره پروبیوتیکی استفاده شد و نتایج این‌گونه نشان داد که افزایش غلظت عصاره مورد مطالعه باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها به صورت وابسته به دوز (Dose Dependent) می‌شوند. مقادیر IC₅₀ برای عصاره پروبیوتیکی ۳۰۰ ug/ml محاسبه و ارزیابی شد (نمودار ۱).

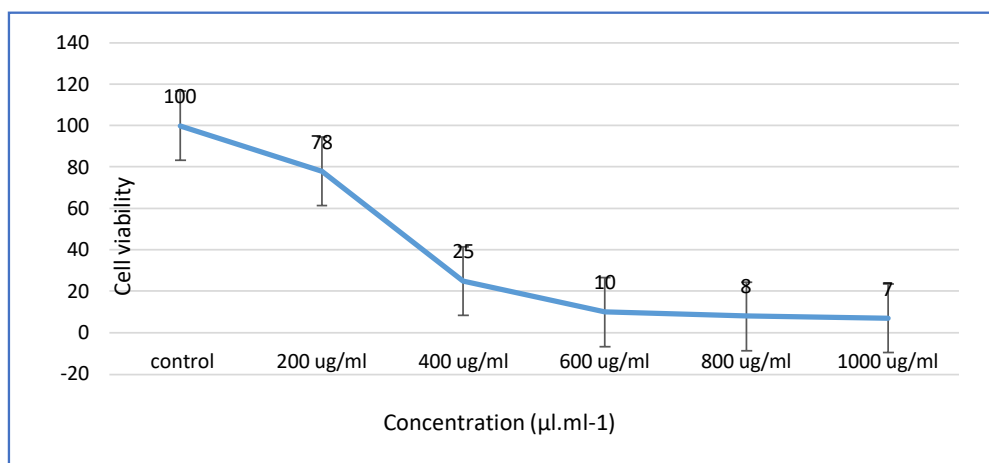
جدول (۱): پرایمرهای استفاده شده برای Real Time-qPCR

Location	Sequence (5'-3')	Strand	Tm °C	Purification
Primer bcl-2: Amplicon Size = 119 bp				
951553-951648	GTGGATGACTGAGTACCTGA	Forward	59.3	DESALT
	AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	Reverse	58.4	DESALT
Primer bax-2: Amplicon Size = 152 bp				
456312-478926	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	Forward	55.9	DESALT
	CAGCTCCATGTTACTGTCCA	Reverse	56.8	DESALT
Primer GAPDH: Amplicon Size = 102 bp				
154148-154228	CAGGTCAATCTTCACTTC	Forward	63.3	DESALT
	ATGATCCACAGTAGCG	Reverse	61.3	DESALT



شکل (۱): رده سلولی HT-29 قبل و بعد از تیمار با متابولیت‌های باکتریایی

(A و B). سلول‌های تیمار نشده در زمان آزمایش در پلیتهای ۴۲ خانه (C) سلول‌های تمایز یافته جهت تیمار سلولی (D). سلول‌های تیمار شده با متابولیت‌های باکتریایی به مدت ۴۲ ساعت.

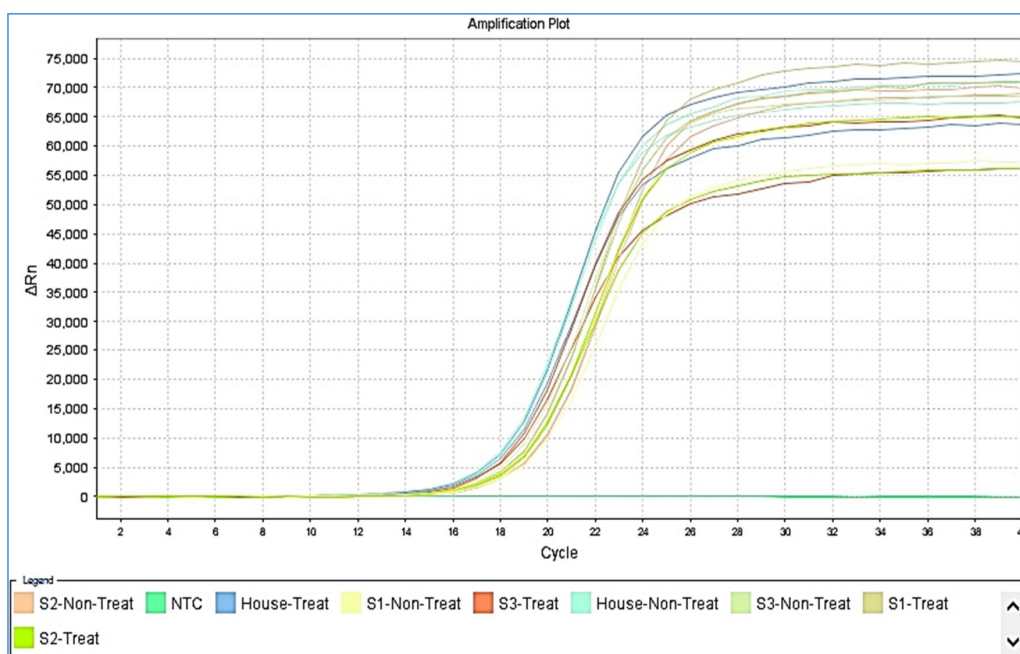


نمودار (۱): درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی HT-29 در اثر اعمال غلظت‌های متفاوت عصاره پروبیوتیک

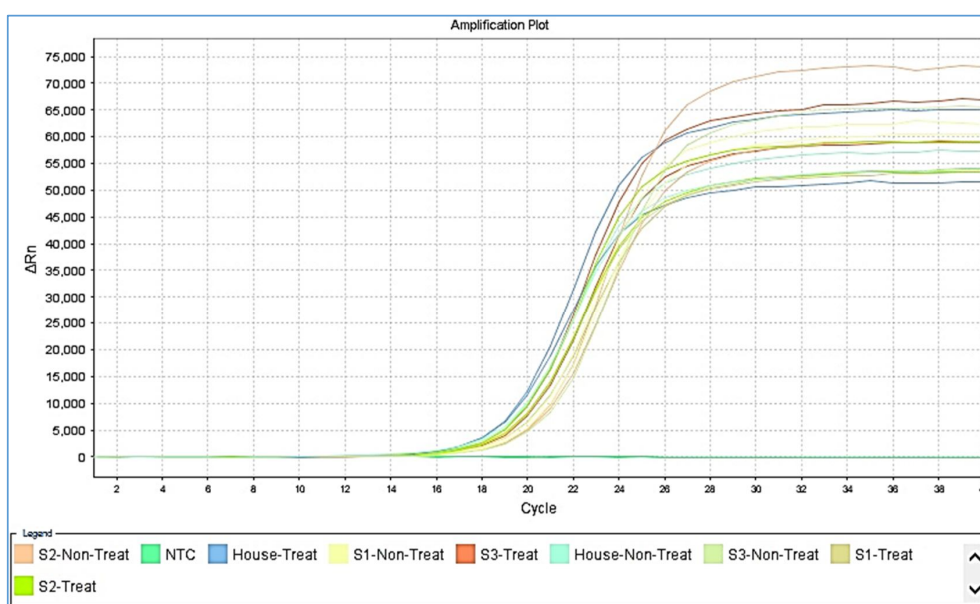
است، درواقع میزان ژن *bcl2* در سلول‌های تحت تیمار با سوپرناتانت عاری از سلول لاکتوکوکوس رامنوسوس برابر ۱/۴۴۷ بود که نشان می‌دهد ژن نمونه‌های تیمار نسبت به غیر تیمار ۱/۴۴۷ برابر افزایش یافته است ($P = ۰/۰۲۵$) در حالیکه میزان بیان ژن *bax* در سلول‌های تحت تیمار با سوپرناتانت عاری از سلول لاکتوکوکوس رامنوسوس برابر ۱/۳۴۴ بود که نشان می‌دهد (شکل ۳) ژن مؤثر در آپوپتوز نمونه‌های تیمار نسبت به غیر تیمار ۱/۳۴۴ برابر افزایش یافته است ($P=۰/۰۴$).

به تعداد سه تکرار آزمایش در بیان ژن *bcl2* تحت تأثیر سوپرناتانت عاری از سلول لاکتوکوکوس رامنوسوس و با استفاده از فن Real time PCR سنجش شد که منحنی تکثیر در شکل (۲) قابل مشاهده است که بهترین دما جهت تکثیر پرایمرها دمای ۸۶/۷۹ درجه سانتی‌گراد بوده است، در حالیکه بهترین دما برای ژن *bax* دمای ۸۸/۹۴ درجه بوده است.

با محاسبه میزان Ct در ژن‌های کنترل داخلی، *bax* و *bcl2* در سلول‌های تیمار شده و فاقد تیمار از لحاظ آماری معنی‌دار بوده



شکل (۲): منحنی تکثیر ژن *bcl-2* در واکنش Real Time PCR



شکل (۳): منحنی تکثیر ژن *bax* در واکنش Real Time PCR

بحث

می‌توان از عصاره پروبیوتیک‌های بومی جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی‌خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر و یا به‌عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی روده در بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره برد. مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها کاملاً شناخته‌شده نیست، ولی مکانیسم‌هایی برای توجیه اثرات پیشگیری‌کننده و درمانی آن‌ها در بیماری‌های انسان پیشنهاد شده است. *bax* یک ژن پروآپتوزی است که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌شود و پروتئین Bax سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌ها می‌شود. میزان بیان ژن *bax* به مقدار ۱/۳۴۴ برابر و میزان بیان ژن *bcl-2* به مقدار ۱/۴۴۷ برابر در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب موتاسیون‌ها و ترکیب القاکننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند (۱۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروبیوتیک بومی لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان ژن‌های ضد سرطانی *bax/bcl2* سلولی سرطانی HT-29 مؤثر است. یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها ازجمله لاکتوباسیلوس‌ها، خاصیت ضدتکثیر سلول‌های سرطانی ازجمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است. بنابراین با پروبیوتیک درمانی سرطان، می‌توان با دو مکانیسم رشد سرطان را مهار کرد (۱۷).

ستاری و احمدی‌زاده (۲۰۱۸)، در مطالعه‌ای به بررسی میزان بیان ژن‌های PTEN و AKT1 در کشت همجوار سلول‌های سرطانی کولون HT-29 با باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس پرداختند. نتایج نشان داد باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس میزان بیان ژن AKT1 را کاهش و بیان PTEN را افزایش داده و سلول‌های سرطانی را به سمت آپوپتوز می‌برد. آزمایش MTT نشان داد که غلظت $OD = 0.05$ بیشترین کشندگی طی چهار ساعت را دارد (۱۸).

طبق مطالعه انجام‌شده توسط تاوانیتی و همکاران (۲۰۱۱)، سوبه‌های باکتریایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی سبب کاهش درصد بقای سلول سرطانی HT-29 و Caco-2 می‌شوند. نتایج این محققان نشان داد که اجزای سلولی باکتری کشته‌شده با حرارت مانند دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان هم دارای اثرات سیتوتوکسیک در برابر سلول‌های سرطانی هستند که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد (۱۹).

یان و همکاران (۲۰۰۲) نیز با تحقیق‌های خود نشان دادند که ترکیب‌های محلول ترشح‌شده از لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس رامنوسوس باعث القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمای مونوسیتی می‌شوند؛ در نتیجه می‌توان پروبیوتیک را به‌عنوان عاملی ایمن برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ‌گونه عارضه جانبی در پی ندارد و این با مطالعه ما هم‌خوانی دارد (۲۰).

مواردی باشد. در ادامه تحقیقات آینده پیشنهادهای متعددی وجود دارد که بررسی اینولوژیکی سایر ژن‌های دخیل در آبشار بروز سرطان، بررسی سایر رده‌های سلولی سرطانی و آنالیز عصاره پروبیوتیکی به‌منظور یافتن ترکیبات و ماده مؤثره موجود در عصاره پروبیوتیکی می‌باشند.

نتیجه‌گیری

با توجه به سمیت کم عصاره پروبیوتیک در تست MTT assay و افزایش بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوزیس در سلول‌های روده‌ای، به نظر می‌رسد می‌توان از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های درمانی در پیشگیری و درمان ابتلا به کانسره‌های گوارشی بهره جست. می‌توان از لاکتوکوکوس رامنوسوس بومی جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی کم، بی‌خطر از نظر بیولوژیک و هزینه کمتر و یا به‌عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره جست. پروتئین‌های طرفدار آپوپتوز در خانواده BCL-2، از جمله Bax و Bak، معمولاً بر روی غشای میتوکندری برای گسترش نفوذپذیری و آزادسازی سیتوکروم C و ROS که سیگنال‌های مهم در آبشار آپوپتوز هستند، عمل می‌کنند. این پروتئین‌های پروآپوپتوز به‌نوبه خود توسط پروتئین‌های BH3 فعال می‌شوند و عملکرد BCL-2 و BCL-XL نسبتی آن مهار می‌شوند. از دیگر دلایل مغایرت نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات، می‌توان به Stage مراحل کانسر، نوع پروبیوتیک و متابولیت‌های حاصله، نوع ژن تحت مطالعه و اختلافات متدولوژیک اشاره کرد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و آقای مهندس صادق پور تقدیر و تشکر نمایند.

حمایت مالی:

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی توسط نهاد یا سازمانی دریافت نکرده است.

تعارض منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی بین آن‌ها وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه اقتباسی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد و نتیجه طرح پژوهشی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان با کد اخلاق IR.IAU.KERMAN.REC.1402.013 است.

جهانی شرافت و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی اثر متابولیت میکروبیوتای روده بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال بر روی رده سلولی HT-29 با استفاده از آزمون MTT دریافتند که سلول‌های تیمار شده با متابولیت‌های میکروبیوتا، افزایش تکثیر را با افزایش زمان آزمایش با استفاده از آزمون MTT نشان دادند. این محققین نتیجه گرفتند که با توجه به اینکه متابولیت‌های میکروبی در این مطالعه قادر به ایجاد پرولیفراسیون در سلول‌های روده‌ای بودند و افزایش زنده ماندن سلول‌ها مشاهده شد، به نظر می‌رسد اختلالات متابولیت‌های میکروبی در روده به علت تغییرات رژیم غذایی یا محیطی و یا دیگر ریسک فاکتورهایی که موجب برهم خوردن ساختار میکروبیوتای روده شود می‌تواند در ایجاد و پیشرفت سرطان کولورکتال نقش داشته باشد (۲۱).

در مطالعه زیبا سازطابی و همکاران (۲۰۲۰)، به بررسی تأثیر کشت هم‌جوار باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز بر میزان بیان ژن‌های *bax* و *bcl2* در سلول‌های سرطانی پرداخته شد. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد تیمار سلول‌های HT-29 با باکتری لاکتوباسیلوس رامنوز باعث تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی می‌شود. همچنین نتایج Real time PCR نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوز سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *bax* و *casp3* در مقایسه با ژن کنترل در سلول‌های سرطانی کولون HT-29 شد (۲۲). نتایج مطالعات فوق و مطالعه حاضر نشان داد که مکانیسم پروبیوتیک میکروبی موجب افزایش این نسبت و پیشروی سلول به سمت آپوپتوز می‌شود. باین حال هنوز جزئیات دقیق‌تری در عملکرد پروبیوتیک میکروبی بر تغییرات بیان ژن‌های درگیر در سرطان‌ها باقی مانده که نیازمند مطالعات و آزمایش‌های بیشتری در این راستا است زیرا استفاده از پروبیوتیک میکروبی بر پایه اطلاعات و عملکرد علمی آن‌ها به دلیل نداشتن عوارض جانبی جهت درمان بیماری‌های شایع امروزه، بسیار مفید است (۲۶-۲۳). به‌طور کلی با استناد به نتایج مطالعه حاضر و مشابه می‌توان گفت، پروبیوتیک میکروبی می‌تواند بر بیان ژن‌های دخیل در سرطان روده مؤثر باشد که این تغییرات بیانی موجب مرگ سلول سرطانی می‌شود.

نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند مورد استفاده شرکت‌های دانش‌بنیان برای تولید داروهای پروبیوتیک میکروبی بالاکتوکوکوس رامنوسوس در جهت کنترل و بهبود پیشرفت بیماران مبتلا به سرطان روده قرار گیرد. عوامل محدودیت، مجموعه عواملی که در اختیار پژوهشگر نیستند اما در یافته‌ها و دستاوردهای پژوهشی تأثیرگذار هستند. از عمده‌ترین ارکان تحقیق و پژوهش دسترسی به آمار و اطلاعات است که جزئی از محدودیت‌ها هستند. نقاط ضعف و قوت ابزارهای آزمایشگاه و عدم همکاری مراکز تحقیقاتی در پژوهش است. نوآوری در پژوهش ممکن است یکی از محدودیت‌های پژوهش در چنین

References:

1. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinog* 2010;31(1):100-10. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp263>
2. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol Review/ Prz Gastroenterol* 2019;14(2):89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
3. Cheng Y, Ling Z, Li L. The intestinal microbiota and colorectal cancer. *Front Immunol* 2020;11:615056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>
4. Śliżewska K, Markowiak-Kopeć P, Śliżewska W. The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers* 2020;13(1):20. <https://doi.org/10.3390/cancers13010020>
5. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS J* 2018;285(3):416-31. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>
6. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. [Retracted] Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Res Int* 2014;2014(1):150845. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>
7. Ghasemi A, Khanzadeh T, Heydarabad MZ, Khorrami A, Esfahlan AJ, Ghavipanjeh S, et al. Evaluation of BAX and BCL-2 gene expression and apoptosis induction in acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM after high-dose prednisolone treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2018;19(8):2319.
8. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC cancer* 2021;21(1):1325. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09054-2>
9. Davoodvandi A, Fallahi F, Tamtaji OR, Tajiknia V, Banikazemi Z, Fathizadeh H, et al. An update on the effects of probiotics on gastrointestinal cancers. *Front Pharmacol* 2021;12:680400. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.668567>
10. Ding S, Hu C, Fang J, Liu G. The protective role of probiotics against colorectal cancer. *Oxidative J Mol Cell Med* 2020;2020(1):8884583. <https://doi.org/10.1155/2020/8884583>
11. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncog* 2020;39(26):4925-43. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>
12. Chen Z-Y, Hsieh Y-M, Huang C-C, Tsai C-C. Inhibitory effects of probiotic *Lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. *Mol* 2017;22(1):107. <https://doi.org/10.3390/molecules22010107>
13. Askari N, Shafieipour S, Aghajanzpour M. Role of BAX, BCL-2, and MICAL-2 genes in esophageal cancer. *Res Med* 2019;43:170-6.
14. Udommethaporn S, Tencomnao T, McGowan EM, Boonyaratanakornkit V. Assessment of anti-TNF- α activities in keratinocytes expressing inducible TNF- α : a novel tool for anti-TNF- α drug screening. *PLoS One* 2016;11(7):e0159151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159151>
15. ECDC. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe-annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. European Centre for Disease Prevention and Control Stockholm, Sweden; 2018.
16. Wang Z, Li L, Wang S, Wei J, Qu L, Pan L, et al. The role of the gut microbiota and probiotics associated with microbial metabolisms in cancer prevention and therapy. *Front Pharmacol* 2022;13:1025860. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1025860>
17. Bedada TL, Feto TK, Awoke KS, Garedew AD, Yifat FT, Birri DJ. Probiotics for cancer alternative prevention and treatment. *Biomed Pharmacother*

- 2020;129:110409.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110409>
18. Ahmadizadeh C. The study of expression of PTEN and AKT1 genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*. *Feyz Med Sci J* 2018;22(6):624-31.
19. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 2011;6(3):261-74. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>
20. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(52):50959-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207050200>
21. Jahani-Sherafat S, Azimirad M, Ghasemian-Safaei H, Amoli HA, Moghim S, Sherkat G, et al. The effect of intestinal microbiota metabolites on HT29 cell line using MTT method in patients with colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench* 2019;12(Suppl1):S74.
22. ZibasazTalebi A, Ahmadizadh C. The Study of Expression of Casp3/Bax Genes in HT29 Colon Cancer Cell Line with *Lactobacillus rhamnosus* Co-Culturing. *J Ilam Univ Med Sci* 2020;28(4):25-35. <https://doi.org/10.29252/sjimu.28.4.25>
23. Adeli H, Ahmadizadeh C, Sadeghi Zali MH. Investigation of the Effect of *Lactobacillus Brevis* Bacteria on the Expression of Rel A, IKB, and Casp3 Genes in HT29 Colon Cancer Cells. *Intern Med Today* 2022;28(3):330-53. <https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3277.3>
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. *Journal of Medical Sciences Studies* 2018;29(4):270-81.
25. Taheri H, Yazdi, Mahdavi, Shekhargazar, Bayat, Mansour, et al. Evaluation of the protective effect of administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in reducing the severity of infection caused by *Candida albicans* in BALB/c mouse model. *Journal of Medical Sciences Studies* 2013;23(7):784-91.
26. Bash A, Baran, Pakdel A, Hassan M, Zuhair, Zare, et al. Studying the effect of *Lactobacillus rhamnosus* (LMG 18243) administration on the growth of breast cancer in inbred BALB/c mice. *Journal of Medical Sciences Studies* 2011;22(3):230-8.

THE EFFECT OF NATIVE PROBIOTICS ON THE EXPRESSION OF *BAX/ BCL2* ANTICANCER GENES IN HT-29 CANCER CELLS BY REAL TIME PCR METHOD

Aida Pourkhorasani¹, Noushin Khandan Dezfali^{2*}, Mahsa Forghani³, Ehsan Stabraghi⁴, Kumarss Amini⁵

Received: 07 December, 2024; Accepted: 04 February, 2025

Abstract

Background & Aims: Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors in humans. Probiotics affect the balance of beneficial and harmful bacteria in the intestine, shifting this balance in favor of increasing the population of beneficial bacteria and providing health benefits. Therefore, the aim of the present study is to investigate the effect of indigenous probiotics on the expression of anti-cancer genes *Bax* and *Bcl-2* in HT-29 cancer cells using the real-time PCR method.

Materials & Methods: In this study, after culturing HT-29 cancer cells and treating them with probiotic extract, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Real-time PCR was performed using primers specific to the anti-cancer genes *Bax* and *Bcl-2* in a Corbett device. The MTT assay was also performed to investigate the toxicity of the native probiotic extract.

Results: The MTT assay showed that increasing the concentration of the studied extract caused a dose-dependent decrease in cell viability. The IC₅₀ value for the probiotic extract was calculated to be 300 µg/mL. Additionally, the expression levels of *Bax* and *Bcl-2* genes in cells treated with *Lactococcus rhamnosus* cell-free supernatant were 1.344 and 1.447, respectively, indicating an increase in the expression of these two genes. (The expression level of the *Bax* gene increased by 1.344-fold, and the expression level of the *Bcl-2* gene increased by 1.447-fold in the treatment group compared to the control group ($p < 0.05$). It is necessary to mention the p-value.)

Discussion: Considering the low toxicity of the probiotic extract in the MTT assay and the increase in the expression of *Bax* and *Bcl-2* genes, it seems that probiotics can be used as therapeutic supplements in the prevention and treatment of gastrointestinal cancers. These findings indicate that indigenous probiotics can be used as a novel therapeutic strategy with high efficacy and low side effects for the treatment and prevention of colon cancer.

Keywords: Probiotic extract, gene expression, colon cancer, MTT assay, real-time PCR

Address: Department of Studies in Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

Tel: +982144868555

Email: nooshinkhandan22@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2025; 35(9): 755 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 MSc Student, Department of Cellular and Molecular Biology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran

² Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran (Corresponding Author)

³ Doctoral Student in Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Department of Microbiology, Shahr Babak Branch, Islamic Azad University, Shahr Babak, Iran

⁵ Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran