مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و دو، شماره هفت، مهر ۱۴۰۳
تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۰۲/۲۳
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۵/۰۱

بررسی تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ساکئی در افزایش آپوپتوز و کاهش سلول‌های سرطانی MCF-7 از طریق مدولاسیون ژن‌های *Bax* و *Bcl2*

الهام همتی[۱]، حسین سازگار*[۱]

مقاله پژوهشی

مقدمه: شواهد فزآینده‌ای نشان می‌دهد که القای آپوپتوز یک استراتژی مهم برای کنترل تکثیر بیش از حد سلول‌های سرطانی پستان است. در این مطالعه اثر سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ساکئی بر میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی (Bax/Bcl2) در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در تحقیق حاضر که به‌صورت تجربی انجام شد، با کشت رده سلولی MCF-7 در محیط کشت DMEM محتوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از سوپرناتانت ساکئی و انکوبه شدن در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سایتوتوکسیسیتی با روش رنگ‌سنجی MTT طبق دستورالعمل کیت در هر سه زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های رده MCF-7 نیز با غلظتی از سوپرناتانت که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی گردید (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) برای بررسی بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* ظرف مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* از طریق آنالیز RT-Real Time- PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که توان زیستی سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان، در مقایسه با گروه کنترل در دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به پایین‌ترین مقدار خود می‌رسد. به‌علاوه تیمار سلول‌های رده MCF-7 با دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی- لیتر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی و انکوباسیون آن برای مدت ۷۲ ساعت، افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *BAX* (p-value=۰ =۰/۰۰۳۳) و کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن *BCL-2* (p-value= ۰/۰۲۷۸) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج بیان می‌کنند که سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی قادر است از طریق القای مسیر آپوپتوزی توان زیستی سلول‌های سرطان پستان را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس ساکئی، MCF-7، سرطان پستان، آپوپتوز، Bax، Bcl2

ارجاع: همتی الهام، سازگار حسین. **بررسی تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ساکئی در افزایش آپوپتوز و کاهش سلولهای سرطانی MCF-7 از طریق مدولاسیون ژن‌های Bax و Bcl2**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۷): ۶۶-۸۰۵۶.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۳، پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com، صندوق پستی :۱۶۶

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

مقدمه

بر اساس برآوردهای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer) مبنی‌بر ۱۸/۱ میلیون مورد جدید ابتلا به سرطان و مرگ ۹/۶ میلیون نفر ناشی از آن در سال ۲۰۱۸ و افزایش نرخ بروز آن به ۲۷/۵ میلیون نفر تا سال ۲۰۴۰، سرطان به سرعت در حال تبدیل شدن به مهم‌ترین مسئله بهداشت در جهان است (۱). در میان انواع مختلف سرطان، گزارش‌های اپیدمیولوژیک منتشر شده حاکی از افزایش قابل توجه میزان بروز (۲/۰۹ میلیون مورد جدید در سال ۲۰۱۸) و مرگ و میر (۶۲۷۰۰۰ نفر در سال ۲۰۱۸) ناشی از سرطان پستان، طی دو دهه گذشته در نقاط مختلف جهان بوده است (۲, ۱). سرطان پستان با ناهمگنی و میزان عود بالا و پیش‌آگهی ضعیف (۳) به سه زیرگروه؛ گیرنده استروژن مثبت، Human (HER_2) epidermal growth factor receptor 2 مثبت و سه گانه منفی دسته‌بندی می‌شود. مبتلایان به زیر گروه استروژن مثبت معمولا با تاموکسیفن و مهارکننده‌های آروماتاز، بیماران HER_2 مثبت عمدتاً با تراستوزومب (آنتی‌بادی مونوکلونال علیه HER_2) و بیماران سه گانه منفی درپی عدم بیان ملکول‌های خاص از طریق عوامل شیمی‌درمانی استاندارد نظیر دوستاکسل و دوکسوروبیسین تحت درمان قرار می‌گیرند (۴-۷) که مصرف آنها عوارض جانبی بالقوه، از جمله ورم لنفاوی، کاهش وزن، درد و نوروپاتی محیطی را در مبتلایان به دنبال دارد. علاوه بر این، اگرچه سرطان پستان در ابتدا به شیمی‌درمانی مرسوم پاسخ می‌دهد، اما در نهایت در مرحله پیشرفته بیماری مقاومت پیدا کرده و برخی بیماران در عرض پنج سال عود را نشان می‌دهند. از این‌رو یک نیاز فوری برای ایجاد راهکارهای درمانی موثرتر، نسبت به روش‌های مرسوم به منظور بهبود طول بقاء مبتلایان احساس می‌شود. مانند سایر انواع سرطان‌ها، مقاومت در برابر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) و تکثیر کنترل نشده سلول‌ها از ویژگی‌های اصلی سرطان سینه است که بر اثربخشی درمان تأثیر می‌گذارد (۸). آپوپتوز نوعی خودکشی سلولی است که توسط سیگنال‌های خارج سلولی (مسیر خارجی) یا درون سلولی (مسیر داخلی) ایجاد شده (۹) و با خصوصیات بیوشیمیایی همچون، فشردگی سلولی، قطعه قطعه شدن هسته، تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA، تخریب mRNA و تشکیل اجسام آپوپتوتیک ظاهر می‌شود (۱۰). وقوع بیش از حد آپوپتوز آتروفی را در پی خواهد داشت، در حالی‌که آپوپتوز ناکافی با تکثیر سلولی کنترل نشده همراه است. در سلول‌های طبیعی پستان، تعادلی بین تکثیر سلولی و آپوپتوز، برای حفظ هموستاز سلولی وجود دارد. اختلال در این تعادل، یعنی فعال شدن مسیر پیام‌رسان ضد آپوپتوزی یا نقص در مسیر پیشبرنده آپوپتوز می‌تواند منجر به تکثیر کنترل نشده سلولی، مقاومت درمانی و عود سلول‌های سرطانی پستان شود (۸). در سلول‌های سرطانی پستان، عوامل متعددی از جمله، فاکتور رشد، آسیب DNA، گونه‌های فعال اکسیژن و پرتوهای رادیواکتیو می‌توانند رشد کنترل نشده سلولی را از طریق مسیرهای پیام‌رسان میتوکندریایی، PI3K/AKT، FasL/Fas، با واسطه فاکتور هسته‌ای κB و با واسطه MAPK افزایش دهند (۱۱). بنابراین، تنظیم بقا و مرگ سلولی در سطح مولکولی در فرآیند آپوپتوز می‌تواند یک استراتژی درمانی کارآمد برای سرطان پستان باشد (۸). اخیرا فواید پروبیوتیک‌ها در برابر سرطان پستان مشخص شده است (۱۲). پروبیوتیک‌ها (باکتری‌ها یا مخمرها) به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که وقتی در مقادیر کافی (در غذا یا به عنوان مکمل‌های غذایی) تجویز شوند، برای میزبان مفید هستند. رایج‌ترین سویه‌های باکتریایی مورد استفاده برای اهداف پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک (گروهی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر متحرک، بی‌هوازی یا میکروآئروفیل) هستند که به‌طور طبیعی در محصولات غذایی تخمیر شده وجود دارند. ترکیبات سنتز شده توسط این باکتری‌های معمولاً سمیت سلولی پایینی دارد و فاقد عوارض جانبی خاصی می‌باشند (۱۳). نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند در تنظیم آپوپتوز سلولی از طریق مسیرهای درونی (فعال‌سازی پروتئین‌های آپوپتوزی Bax و Bak یا غیرفعال‌سازی پروتئین‌های ضد آپوپتوزی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

خانواده Bcl-2) و بیرونی (از طریق گیرنده‌های Fas/TNFR یا سایر عوامل برای القای مسیر مرتبط با کاسپاز) نقش داشته باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک القای آپوپتوز به واسطه ۵-فلوروئوراسیل را افزایش داده و باعث فعال شدن مرگ سلولی، مستقیماً با القای *Beclin-1* و *GRP78* و به‌طور غیرمستقیم از طریق القای *Bcl-2* و *Bak* می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک نیز ممکن است از طریق کاهش‌دهنده محصولات ژنی وابسته به فاکتور هسته‌ای NF-κB که بقا سلولی را به واسطه ژن‌های ضد آپوپتوزی *Bcl-2* و *Bcl-xL* تنظیم می‌کند، از سرطان جلوگیری نمایند (۱۴). در میان گونه‌های لاکتوباسیلوس، یک پروبیوتیک مهم لاکتوباسیلوس ساکئی است که اثرات ضد چاقی (۱۵)، ضد کولیت روده (۱۶)، آنتی‌اکسیدانی (۱۷)، تحریک‌کننده سیستم ایمنی (۱۸)، ضد میکروبی (۱۹)، ضد دیابت و ضد ملانوژنیک (۲۰) و ضد سرطانی (۲۲, ۲۱) متابولیت‌های تولیدی آن شناخته شده است. با این‌حال، با توجه به نیاز به تحقیقات هر چه بیشتر جهت تایید اثرات ضد سرطانی آن، از آنجائیکه تاکنون هیچ پژوهشی برای ارزیابی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی بر تنظیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی پستان در سطح مولکولی وجود ندارد، در تحقیق حاضر اثر سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ساکئی بر میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

این مطالعه پژوهشی به‌صورت تجربی در مراکز تحقیقات سلولی - تکوینی و باکتری‌شناسی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. رده سلول سرطانی پستان (MCF-7) و باکتری مورد نظر تحقیق یعنی لاکتوباسیلوس ساکئی (IBRC-M 10666) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری گردید.

کشت میکروبی و سلول سرطانی: برای به‌دست آوردن سوپرناتانت ابتدا باکتری لاکتوباسیلوس ساکئی بر روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید، سپس با استفاده از سوآپ استریل از کلنی باکتری مورد نظر برداشته و درون محیط کشت (TSB) استریل شده کشت داده شد و درون انکوباتور شیکردار (GFL 3033, Germany) به‌صورت شیب‌دار در دمای ۴۰°C با دور ۲۵۰ rpm قرار گرفت. بعد از گذشت ۷۲ ساعت کشت میکروبی در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس سلول‌ها از سوپرناتانت جداسازی شد و از سوپرناتانت سلول‌ها جهت بررسی فعالیت ضد سرطانی استفاده گردید (۲۲, ۲۱). رده سلولی MCF-7 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO۲، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت‌کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/ EDTA استفاده شد.

سنجش توان زیستی: توان زیستی سلول‌های رده MCF-7 تیمار شده با غلظت‌های مختلف سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس ساکئی توسط تست MTT، با استفاده از کیت (CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) با شماره محصول G4000 مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی کشت داه شد و سپس با غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر سوپرناتانت ساکئی برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار و انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار گردآوری شد و مقدار ۲۰ µl محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و انکوباسیون چهار ساعته صورت گرفت. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه (ELISA-reader, Awareness Technology, USA) با طول موج ۵۷۰ nm خوانش گردید (۲۲). اطلاعات مربوط به اثر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی بر رشد سلول MCF-7 با شاخص IC50 (غلظتی از دارو که رشد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

سلول را نسبت به کنترل ۵۰ درصد کاهش می‌دهد) ارائه شدند. IC50ها از طریق رسم منحنی‌های رشد سلول در برابر رقت‌های مختلف سوپرناتانت و از طریق رسم معادله رگرسیون غیر خطی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت سوپرناتانت محاسبه گردید.

سنجش بیان ژن: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2*، تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد، و سپس، با غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی در بازه زمانی ۷۲ ساعت تیمار و انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، سلول‌ها در دو گروه تست شامل غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی و گروه کنترل، برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از معرف RNX-Plus Solution for total RNA) RNX^{TM} –PLUS isolation)، جدا گردید. به منظور انجام مرحله Heat block، نمونه‌های حاصل از مرحله‌ی قبل در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه تمام توالی‌های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Perfect PrimeScript^{TM} RT Reagent kit (Real Time)، (Takara)، به cDNA تبدیل و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سنجش میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل (Rotor gene 3000 corbett, Australia) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام واکنش، مخلوط واکنشی متشکل از cDNA، به مقدار ۱ میکرولیتر، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، RNase-free water، به مقدار ۵/۵ میکرولیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Master Mix RT-PCR) (Ampliqon) تهیه گردید (۲۳). توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن‌های *GAPDH*، *Bax* و *Bcl2* با استفاده از نرم افزار Oligo6 طراحی و سپس با Blast نمودن آن‌ها در NBCI از صحیح بودن آنها اطمینان حاصل شد و نهایتاً توسط شرکت Macrogen سنتز شدند (جدول ۱). از ژن *GAPDH*، به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سپس مخلوط واکنش پس از آماده‌سازی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تحت تاثیر برنامه‌ی دمایی ذکر شده در جدول ۲ قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

نهایتاً بررسی آماری با استفاده از آزمون و من ویتنی (به‌طورکلی آزمون ناپارامتریک به نرمال بودن یا نبودن توزیع داده‌ها حساس نیست و در هر شرایطی قابل استفاده است) از طریق نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $P < ۵٪$ معنی‌دار محسوب گردید.

نتایج

توان زیستی سلول‌های رده MCF-7 تیمار شده با غلظت‌های سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)، پس از گذشت زمان‌های سه گانه انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می‌باشد که توان زیستی سلول‌های MCF-7 سرطان پستان، در مقایسه با گروه کنترل در دوزهای مختلف سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی (۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تفاوت معنی‌داری نداشته و توان زیستی سلول‌ها در دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به پایین‌ترین مقدار خود رسیده است (شکل ۱ و ۲). در این روش غلظت سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی در نقطه IC50 به عنوان غلظتی که بقای سلولی را ۵۰ درصد کاهش می‌دهد ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر بوده است (جدول۳).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

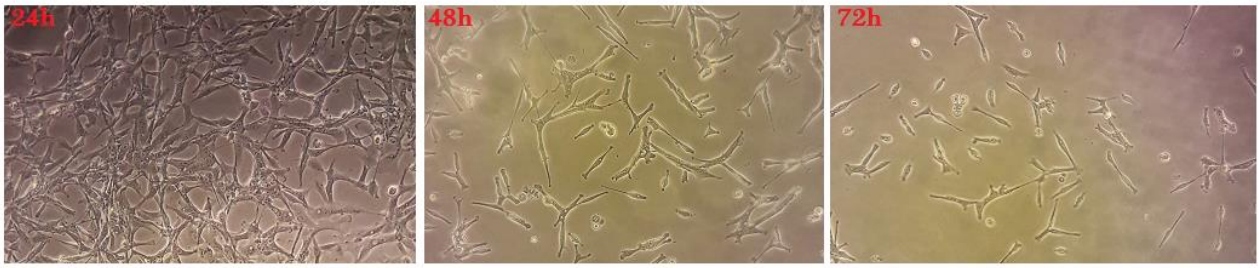
CC BY-NC 4.0

جدول ۱: مشخصات پرایمر مربوط به ژن‌های *BAX*، *BCL-2* و *GAPDH*

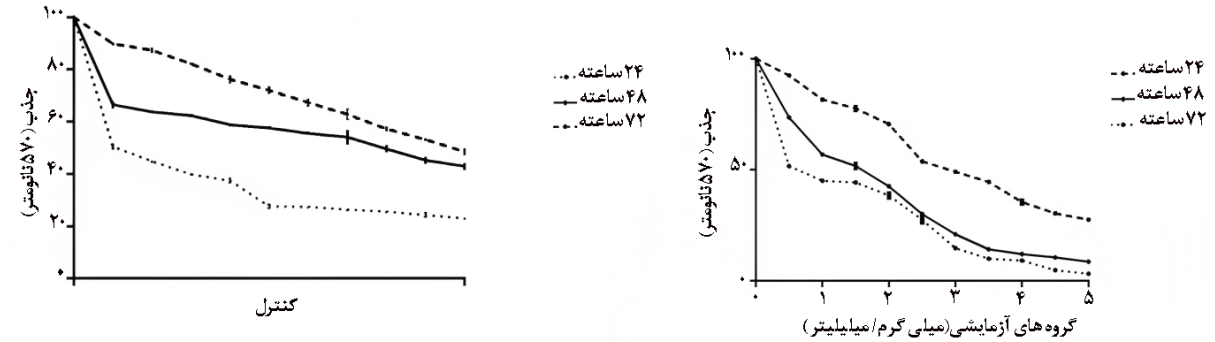
Annealing Tem (°C)	Amplification size	Primers			Official Name (gene)	
64	234	22	AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC	F	*BAX*	1
		22	GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG	R		
64	245	20	GACGACTTCTCCCGCCGCTAC	F	*BCL-2*	2
		24	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCCAC	R		
64	183	23	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC	F	*GAPDH*	3
		23	GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC	R		

جدول ۲: شرایط دمایی واکنش Rael Time PCR

۱ سیکل	۹۵ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	PCR initial denaturation step
۴۰ سیکل	۶۴ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Annealing *BAX* gene
	۶۴ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Annealing *BCL-2* gene
	۶۴ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Annealing *GAPDH* gene
	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	Final Extension



شکل۱: تاثیر غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر (غلظتی که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی گردید) سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی بر رده سلولی MCF-7 برای مدت زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



شکل۲: تاثیر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی بر توان زیستی سلول‌های رده MCF-7 در مدت زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

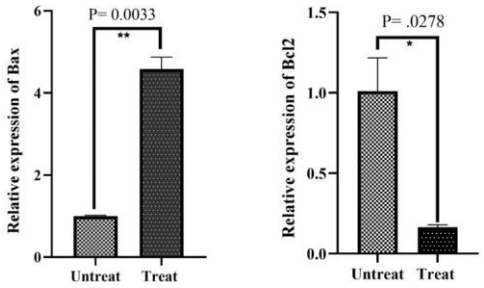
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

جدول۳: غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی در نقطه IC50 در روش MTT

IC50 value (mg/ml)		
۷۲ ساعته	۴۸ ساعته	۲۴ ساعته
۰/۵۳	۱/۵۸	۲/۸۸

تیمار سلول‌های رده MCF-7 با دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی و انکوباسیون آن برای مدت ۷۲ ساعت، افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *BAX* (p-value=۰/۰۰۳۳) و کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن *BCL-2* (p-value= ۰/۰۲۷۸) را نشان داد. نمودارهای زیر این تغییر بیان را در ژن‌های *BAX* و *BCL-2* براساس ΔΔCt نمایش می‌دهند (شکل۳).



شکل۳: نمودار میزان بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* براساس Ct در غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی و زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت

بحث

سالیان دراز باکتری‌ها به عنوان دشمنان انسان شناخته می‌شدند، شاید عجیب باشد اما واقعیت این است که همه باکتری‌ها مضر نبوده و بعضی از خانواده‌های باکتریایی نظیر پروبیوتیک‌ها گاها مفید نیز هستند و امروزه از آنها در ساخت داروها، هورمون‌ها، واکسن‌ها و آنزیم‌ها به عنوان یک جزء اصلی در فرآیند تولید استفاده می‌شود. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده و مشخصی هستند که درصورت مصرف در انسان یا حیوان، با اثر بر روی فلور میکروبی بدن باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شوند. اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند. باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت‌کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد. فلور میکروبی روده حاوی بیش از صد تریلیون باکتری زنده است که به انواع مفید، مضر و خنثی برای سلامتی انسان تقسیم می‌شوند. در یک فرد سالم بین باکتری‌های مفید و مضر توازن وجود دارد، اما بسیاری از عوامل مثل استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها، اشعه درمانی، آب درمانی، شیمی درمانی، استفاده از آب کلردار، غذاهای حاوی ترکیبای دارویی و استفاده از الکل، حساسیت‌های غذایی، عمل جراحی، آسیب‌های فیزیکی، استرس‌های شدید، توکسین‌های محیطی و حساسیت‌های ژنتیکی می‌تواند سبب از بین رفتن میکروب‌های مفید موجود در بدن فرد شود و با غالب شدن میکروب‌های مضر در روده، فرد دچار امراض و بیماری‌هایی مثل اسهال، پوکی استخوان، افزایش کلسترول خون، کاهش قدرت پاسخ‌گویی بدن به تحریکات خارجی و غیره خواهد شد. با مصرف پروبیوتیک‌ها، کلنی‌های مفیدی ایجاد می‌شوند که می‌توانند مانند محیط باکتریایی طبیعی روده به سلامتی انسان کمک کنند و در عین حال زمانی را فراهم آورند که محیط باکتریایی طبیعی روده، خود را ترمیم و بازسازی کند و سپس این کلنی‌ها به تدریج توسط محیط باکتریایی طبیعی روده که خود را بازسازی کرده است، جایگزین خواهند شد. از این رو پروبیوتیک‌ها را ترمیم کننده‌های زیستی می‌نامند. پروبیوتیک‌ها نیز با تعدیل باکتری‌های دستگاه گوارش و سیستم ایمنی سیستمیک در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]
[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

پیشگیری یا درمان سرطان پستان نقش ایفا می‌کنند (۲۵،۲۴). در تحقیق حاضر خاصیت ضد تکثیری سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس ساکئی بر سلول‌های سرطانی پستان که از طریق القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اعمال می‌گردد، در سلول‌های رده MCF-7، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق توان زیستی سلول‌های تحت تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی از طریق کیت MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که سلول‌ها برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی انکوبه شدند و غلظتی از دارو که سبب کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی می‌شود، محاسبه گردید. نتایج حاصل شده از این تست حاکی از آن می‌باشد که سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی قادر است رشد سلول‌های سرطانی پستان را در دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به پایین‌ترین مقدار خود رساند. به علاوه در این تحقیق توانایی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی در تغییر بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی در سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تیمار سلول‌های MCF-7 سرطان پستان، با دوز ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس ساکئی و انکوباسیون آن برای مدت ۷۲ ساعت، افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *BAX* (p-value=۰/۰۰۳۳) و کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن *BCL-2* (p-value= ۰/۰۲۷۸) را نشان داد. به طور مشابه تاکنون مطالعات متعددی در شرایط آزمایشگاهی و حیوانی برای بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر سرطان پستان انجام شده است (۲۶). برای مثال، تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس هر روز از دو هفته قبل از پیوند تومور سرطان پستان و ۳۰ روز پس از پیوند با فواصل ۳ روزه ادامه یافت. نتایج افزایش قابل توجهی را در مدت بقا گروه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که بیانگر آنست که این درمان می‌تواند پاسخ‌های ایمنی را از طریق تحریک تولید سایتوکین‌های پیش التهابی مانند IFN-γ و مهار تولید سیتوکین‌های ضد التهابی مانند IL-4 و IL-10 افزایش دهد. مطالعات حیوانی نیز تایید کرد که تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس فعالیت ضد سرطانی را در موش‌های حامل تومور پستان نشان می‌دهد (۲۷). در مطالعه دیگری، نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی لاکتوباسیلوس کازئی به صورت خوراکی با استفاده از لوله تغذیه معده استاندارد به موش‌ها خورانده شد. سوسپانسیون روزانه به مدت دو هفته متوالی قبل از پیوند زیر جلدی تومور آدنوکارسینومای پستان به موش داده شد. سپس تزریق به مدت سه هفته با فاصله ۳ روزه بین هر هفته ادامه یافت. تجزیه و تحلیل داده ها کاهش معنی‌داری در سرعت رشد تومورها را نشان داد و بقا در مقایسه با گروه شاهد به‌طور قابل‌توجهی طولانی شد. مطالعه به این نتیجه رسیده است که تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند بر تحریک تولید سیتوکین Th1 در کشت سلولی طحال موش و سمیت سلولی سلول NK تأثیر بگذارد (۲۸). تجویز خوراکی شیر تخمیر شده حاوی *Lactobacillus helveticus R389* یک پاسخ تنظیم کننده ایمنی را در موش‌های حامل سرطان پستان نشان داد و استفاده از آن به عنوان درمان کمکی ایمنی برای محافظت در برابر این بدخیمی پیشنهاد شده است (۲۹). در موش‌های تحت درمان با نانوذرات سلنیوم غنی‌شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم، افزایش سطح IFN-γ و IL-2 گزارش شد، اما حیوانات همچنین افزایش فعالیت سلول‌های NK را نشان دادند (۳۰). علاوه بر این، به نظر می‌رسد تجویز خوراکی نانوذرات سلنیوم غنی‌شده با لاکتوباسیلوس برویس با پیش‌آگهی بهتر بیماری در موش‌های دارای تومور پستان با متاستاتیک بالا مرتبط است (۳۱). یک گروه اسلواکی اثربخشی پیشگیرانه یک سویه باکتریایی پروبیوتیک جدید به نام *Lactobacillus plantarum LS/07* را در مدل موشی برای سرطان سینه نشان دادند. *Lactobacillus plantarum LS/07* روزانه و تا پایان آزمایش (۱۶ هفته) تجویز شد. درمان با این پروبیوتیک به طور قابل توجهی تومور را سرکوب کرد، سلول‌های T_{Cd8+} را در بافت تومور افزایش داد و TNF-α و سطح سلول‌های T_{Cd8+} را در خون کاهش داد (۳۲).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تست MTT و RT-Real Time PCR صورت گرفته در تحقیق حاضر، بیانگر این مسئله می‌باشد که سوپرناتانت تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ساکئی قادر است از طریق تاثیرگذاری بر مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی پستان انسان القاء نماید و از این طریق در درمان سرطان پستان مؤثر واقع گردند. پیشنهاد می‌گردد که سایر محققان تاثیر سوپرناتانت تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ساکئی را در سطح بافت روی نمونه‌های بیوپسی سرطان پستان نیز سنجش نمایند.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ساکئی بر میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

حامی مالی: ندارد

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1402.098).

مشارکت نویسندگان

حسین سازگار در ارائه ایده، حسین سازگار و الهام همتی در طراحی مطالعه، الهام همتی در جمع‌آوری داده‌ها، حسین سازگار و الهام همتی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

1-Tuasha N, Petros B. ***Heterogeneity of Tumors in Breast Cancer: Implications and Prospects for Prognosis and Therapeutics***. Scientifica (Cairo) 2020; 2020: 4736091.

2-Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. ***Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study***. Asian Pac J Cancer Prev 2019; 20(7): 2015-20. [Persian]

3-Qiu J, Zhang T, Zhu X, Yang C, Wang Y, Zhou N, et al. ***Hyperoside Induces Breast Cancer Cells Apoptosis via ROS-Mediated NF-κB Signaling Pathway***. Int J Mol Sci 2019; 21(1):131.

4- Nøhr-Nielsen A, Bagger SO, Brünner N, Stenvang J, Lund TM. ***Pharmacodynamic Modelling Reveals Synergistic Interaction Between Docetaxel and SCO-101 in a Docetaxel-Resistant Triple Negative Breast Cancer Cell Line***. Eur J Pharm Sci 2020; 148: 105315.

5- Su P, Ahmad B, Zou K, Zou L. ***β-Elemene Enhances the Chemotherapeutic Effect of 5-Fluorouracil in Triple-Negative Breast Cancer via PI3K/AKT, RAF-MEK-ErK, and NF-κB Signaling Pathways***. Onco Targets Ther 2020; 13: 5207-22.

6- Pal S, Rakshit T. ***Folate-Functionalized DNA Origami for Targeted Delivery of Doxorubicin to Triple-Negative Breast Cancer***. Front Chem 2021; 9: 721105.

7- Shimanuki Y, Shimomura A, Yoshimura K, Terakado H, Shimizu C. ***Are Platinum Drugs Ineffective for Triple-Negative Breast Cancer with***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

Residual Invasive Disease after Neoadjuvant Chemotherapy? J Clin Oncol 2021; 39(31): 3521-3522.

8-Yuan L, Cai Y, Zhang L, Liu S, Li P, Li X. ***Promoting Apoptosis, a Promising Way to Treat Breast Cancer with Natural Products: A Comprehensive Review***. Front Pharmacol 2022; 12: 801662.

9-Suraweera CD, Hinds MG, Kvansakul M. ***Poxviral Strategies to Overcome Host Cell Apoptosis***. Pathogens 2020; 10(1): 6.

10-Roos WP, Kaina B. ***DNA Damage-Induced Cell Death: From Specific DNA Lesions to the DNA Damage Response and Apoptosis***. Cancer Lett 2013; 332(2): 237-48.

11-Rajabi S, Maresca M, Yumashev AV, Choopani R, Hajimehdipoor H. ***The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy***. Biomolecules 2021; 11(4): 534. [Persian]

12-Thu MS, Ondee T, Nopsopon T, Farzana IAK, Fothergill JL, Hirankarn N, et al. ***Effect of Probiotics in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis***. Biology (Basel) 2023; 12(2): 280.

13-Garbacz K. ***Anticancer Activity of Lactic Acid Bacteria***. Semin Cancer Biol 2022; 86(3): 356-66.

14-Zhong L, Zhang X, Covasa M. ***Emerging Roles of Lactic Acid Bacteria in Protection Against Colorectal Cancer***. World J Gastroenterol 2014; 20(24): 7878-86.

15-Ji Y, Park S, Chung Y, Kim B, Park H, Huang E, et al. ***Amelioration of Obesity-Related Biomarkers by Lactobacillus Sakei CJLS03 in a High-Fat Diet-Induced Obese Murine Model***. Sci Rep 2019; 9: 6821.

16-Rather IA, Bajpai VK, Ching LL, Majumder R, Nam GJ, Indugu N, et al. ***Effect of a Bioactive Product SEL001 from Lactobacillus Sakei Probio65 on Gut Microbiota and Its Anti-Colitis Effects in a TNBS-Induced Colitis Mouse Model***. Saudi J Biol Sci 2019; 27: 261-70.

17-Bajpai VK, Rather IA, Park YH. ***Partially Purified Exo-Polysaccharide from Lactobacillus Sakei Probio 65 with Anti-oxidant, α-Glucosidase and Tyrosinase Inhibitory Potential***. J Food Biochem 2016; 40: 264-74.

18-Kim SY, Shin JS, Chung KS, Han HS, Lee HH, Lee JH, et al. ***Immunostimulatory Effects of Live Lactobacillus Sakei K040706 on the CYP-Induced Immunosuppression Mouse Model***. Nutrients 2020; 12(11): 3573.

19-De Carvalho KG, Bambirra FHS, Kruger MF, Barbosa MS, Oliveira JS, Santos AMC, et al. ***Antimicrobial Compounds Produced by Lactobacillus Sakei Subsp. Sakei 2a, A Bacteriocinogenic Strain Isolated from a Brazilian Meat Product***. J Ind Microbiol Biotechnol 2010; 37: 381-90.

20-Bajpai VK, Han JH, Nam GJ, Majumder R, Park C, Lim J, et al. ***Characterization and Pharmacological Potential of Lactobacillus Sakei 1I1 Isolated from Fresh Water Fish Zacco Koreanus***. DARU J Pharm Sci 2016; 24: 1-12.

21-Malaki MS, Rouhi L, Khashei Varnamkhasti K. ***Apoptotic Induction in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line and Growth Inhibition of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

Some Gastrointestinal Pathogenic Species by Lactobacillus Sakei Metabolites. Payavard Salamat 2021; 14(6) :476-83. [Persian]

22- Malaki MS, Rouhi L, Khashei Varnamkhasti K. ***Cytotoxic and Antimicrobial Effects of Lactobacillus Sakei on Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (HT29) and Some Pathogenic Microorganisms***. Tehran Univ Med J 2021; 78 (10): 644-50. [Persian]

23- Varnamkhasti KK, Tavakoli P, Rouhi L, Raisi S. ***Cytotoxicity, Apoptosis Induction and Change of P53, PARP, P21 and Bcl-2 Genes Expression in the Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells Line (SW-1736) with Curcumin***. Genetics & Applications 2021; 5(1): 10-7.

24- Rafter J. ***Lactic Acid Bacteria and Cancer: Mechanistic Perspective***. Br J Nutr 2008; 88 (S1): 89-94.

25- Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. ***The Improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and Phytoestrogens***. Int J Mol Sci 2009; 10(9): 3755-775.

26- Mendoza L. ***Potential Effect of Probiotics in the Treatment of Breast Cancer***. Oncol Rev 2019; 13(2): 422.

27- Yazdi MH, Soltan Dallal MM, Hassan ZM. ***Oral Administration of Lactobacillus Acidophilus Induces IL-12 Production in Spleen Cell Culture of BALB/C Mice Bearing Transplanted Breast Tumour***. Br J Nutr 2010; 104: 227-32. [Persian]

28- Soltan Dallal MM, Yazdi MH, Holakuyee M. ***Lactobacillus Casei Ssp.Casei Induced Th1 Cytokine Profile and Natural Killer Cells Activity in Invasive Ductal Carcinoma Bearing Mice***. IJAAI 2012; 11(2): 183-9.

29- de Moreno A, Matar C, LeBlanc N, Perdigon G. ***Effects of Milk Fermented by Lactobacillus Helveticus R389 on a Murine Breast Cancer Model***. Breast Cancer Res 2005; 7: 477- 86.

30- Yazdi MH, Mahdavi M, Kheradmand E, Shahverdi AR. ***The Preventive Oral Supplementation of a Selenium Nanoparticle Enriched Probiotic Increases the Immune Response and Lifespan of 4T1 Breast Cancer Bearing Mice***. Arzneimittel-Forschung 2012; 62(11): 525-31. [Persian]

31- Yazdi MH, Mahdavi M, Setayesh N, et al. Nanoparticleenriched, S. ***Lactobacillus Brevis Causes More Efficient Immune Responses In-Vivo and Reduces the Liver Metastasis in Metastatic form of Mouse Breast Cancer***. DARU J Pharm Sci 2013; 21: 33. [Persian]

32- Kassayova M, Bobrov N, Strojny L. ***Preventive Effects of Probiotic Bacteria Lactobacillus Plantarum and Dietary Fiber in Chemically Induced Mammary Carcinogenesis***. Anticancer Res 2014; 34(9): 4969-76.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 32| NO 7 | Sep 2024

Received: 12 May 2024
Accepted: 22 July 2024

Evaluation of *Lactobacillus Sakei* Probiotic Supernatant's Effectiveness in Promoting Apoptosis and Decreasing Breast Cancer MCF-7 Cancerous Cells through Modulation of *Bax* and *Bcl2* Genes

Elham Hemati[1], Hossein Sazegar[*1]

Original Article

Introduction: Accumulating evidence has revealed that inducing apoptosis is an important strategy to control excessive breast cancer cell proliferation. In this study, the supernatant effect of the probiotic strain of *Lactobacillus Sakei* on Expression Level of Apoptosis-Related Genes (*Bax*/*Bcl2*) in Breast Cancer Cell Line (MCF-7) was investigated.

Methods: In the experimental study, MCF-7 breast cancer cells were cultured in DMEM medium with 10% bovine serum. The cells were treated in 1, 2, 3, 4 and 5 mg/ml concentrations of *sakei* supernatant and incubated at 24, 48 and 72 hours. The MTT assay was used to measure cytotoxicity effect according to kit manufacturer's protocol in all three incubation times. MCF-7 cells with concentration of *sakei* supernatant at IC50 point (5 mg / ml) to examine the expression of genes *Bax* and *Bcl2* were incubated for 72 hours. Real-Time PCR was performed to analyze the changes in the expression of *Bax* and *Bcl2* genes.

Results: The results of this study indicated that bioavailability of MCF-7 cell line reached the lowest value at concentration of 5 mg/ml compared to the control group. In addition, MCF-7 cell line treatment with Lactobacillus sakei supernatant at a dose of 5 mg/ml and 72 h incubation time, showed significantly increased expression of BAX (p-value= 0.0033) and significantly decreased expression of BCL-2 (p-value= 0.0278).

Conclusion: The results indicate that Lactobacillus sakei supernatant can reduce the bioavailability of breast cancer cells by inducing apoptosis pathway.

Keywords: Lactobacillus Sakei, MCF-7, Breast cancer, Apoptosis, Bax, Bcl2

Citation: Hemati E, Sazgar S. **Evaluation of Lactobacillus Sakei Probiotic Supernatant's Effectiveness in Promoting Apoptosis and Decreasing Breast Cancer MCF-7 Cancerous Cells through Modulation of Bax and Bcl2 Genes.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(7): 8056-66.

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author: Tel:** 09177121993**, email:** hoseinsazgar@yahoo.com

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v32i7.16570]