

## The study of expression of *PTEN* and *AKT1* genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*

Sattari Sh, Ahmadizadeh Ch<sup>2\*</sup>

1- Department of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, I. R. Iran.

2- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, I. R. Iran.

Received: 2018/07/22 | Accepted: 2018/11/21

### Abstract:

**Background:** Colon cancer is one of the most common cancers in the world. Probiotics are viable and useful microorganisms that have an effective role in controlling cancer by influencing the digestive enzymes of animals and humans, inhibition of cancerous agents in the body and in vitro conditions, suppression of lotions, and cancer-inducing compounds and tumors in experimental animals. The present study was conducted to investigate the *PTEN*/*AKT1* cellular signaling pathway in adjacent cultures of *Streptococcus thermophilus* with HT29 colon cancer cells.

**Materials and Methods:** Bacterial culture, supernatant and bacterial extract were prepared and the cells were treated with these materials. Cell necrosis was evaluated by the MTT method. Also, the expression of *PTEN* and *AKT1* genes in HT29 cell line was investigated using the real-time PCR.

**Results:** The results showed that the thermophiles bacterium reduced the expression of *AKT1* genes, and increased the expression of *PTEN* and led the cancerous cells toward apoptosis. The MTT test showed that the concentration of OD=0.05 had the highest mortality in 4 hours.

**Conclusion:** Thermophiles bacteria can be used to create a novel therapeutic effect with high impact, low side effects, harmless biological effect and lower costs. Also, it can be used as an extra treatment appropriate to the body's natural flora for the treatment and prevention of colon cancer.

**Keywords:** Probiotic, Colon cancer, HT29 cell

\* Corresponding Author.

Email: dr\_ahmadizadeh@yahoo.com

Tel: 0098 910 403 0464

Fax: 0098 414 422 8211

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 22, No 6, Pages 624-631

Please cite this article as: Sattari Sh, Ahmadizadeh Ch. The study of expression of *PTEN* and *AKT1* genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*. *Feyz* 2019; 22(6): 624-31.

# بررسی میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در کشت همچوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با باکتری استرپتوكوکوس ترموفیلوس

شیوا ستاری<sup>۱</sup>، چنگیز احمدی‌زاده<sup>\*</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان کولون از سرطان‌های رایج در جهان می‌باشد. پروپویوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که با تأثیر بر آنژیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب لوسيون‌ها و ترکیبات القا-کننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند. هدف مطالعه حاضر بررسی مسیر سیگنالینگ سلولی *PTEN/AKT1* در کشت همچوار باکتری استرپتوكوکوس ترموفیلوس با سلول‌های سرطانی کولون 29 HT می‌باشد.

مواد روش‌ها: از کشت باکتری‌ها، مایع روبی و عصاره باکتریابی تهیه شده سلول‌های سرطانی کولون 29 HT توسط این مواد تیمار شدند. نکروز سلولی با روش MTT بررسی گردید. همچنین، میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در رده سلولی 29 HT با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: باکتری استرپتوكوکوس ترموفیلوس میزان بیان ژن *AKT1* را کاهش داده، بیان *PTEN* را افزایش داده و سلول‌های سرطانی را به سمت آپوپتوز برد. آزمایش MTT نشان داد که غلظت  $0.05\text{ OD}$  بیشترین کشنندگی طی ۴ ساعت را دارد.

نتیجه گیری: می‌توان از باکتری استرپتوكوکوس ترموفیلوس جهت ایجاد یک راه کار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی-خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر و یا به عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره برد.

واژگان کلیدی: پروپویوتیک، سرطان کولون، سلول 29 HT

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۹۷، صفحات ۶۳۱-۶۲۵

سرطان کولون اغلب به شکل پولیپ در سطح جداره داخلی روده ایجاد می‌شود که منشا آن پوشش داخلی روده بزرگ است. این توده‌ها معمولاً غیرسرطانی هستند، ولی اگر درمان نشوند، ممکن است به سرطان کولون تبدیل شوند [۵]. عوامل مختلف مثل عوامل ژنتیکی، محیطی و رژیم غذایی می‌توانند به عنوان عامل سرطان روده بزرگ در نظر گرفته شوند [۶]. نشان داده است که عوامل پیش‌نحوپلاستیک در کولون افراد مبتلا به سرطان کولون وجود دارند. شواهد نشان داده‌اند که پروپویوتیک‌ها می‌توانند به عنوان عوامل پیشگیری و تسکین علایم سرطان کولون داشته باشند [۸]. بیشتر پروپویوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان می‌باشند و در آنجا زندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند. معمول‌ترین میکروارگانیسم‌های پروپویوتیکی به دو گروه باکتری‌ها و قارچ‌ها تقسیم می‌شوند. بعضی از این میکرو-ارگانیسم‌ها سویه‌های انتخابی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدو-باکتریوم هستند؛ گرچه گونه‌هایی از انتروکوکوس، استرپتوكوکوس و اشریشیا کلاری نیز برای این منظور استفاده می‌شوند. از مخمرها نیز ساکارومیسین سروزیزیه و ساکارومیسین بولاردی را می‌توان به عنوان پروپویوتیک نام برد [۹]. در زمینه درمان بیماری التهاب روده‌ای توسط پروپویوتیک‌ها نتایج امیدبخشی حاصل شده است. علاوه بر تنظیم هوموستازی اپیتلیال روده و پاسخ‌های ایمنی،

## مقدمه

یکی از شایع‌ترین انواع سرطان دستگاه گوارش در ایران، سرطان روده بزرگ است که از نظر بروز در مردان ایرانی، رتبه سوم و در زنان، رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است [۱]. در آزمایش‌های برونتنی نشان داده شده که پروپویوتیک‌ها در سرکوب زخم اولیه نفوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ نقش دارند [۲]. اثرات ضد سرطانی پروپویوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیب میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژن، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد [۳]. همچنین، یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروپویوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضد تکثیری سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است [۴].

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی بناب، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، ایران

\* لشان نویسنده مسئول؛

اهر، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر  
تلفن: ۰۹۱۰۴۰۳۰۴۶۴، دوچرخه‌سواری: ۰۴۱۴۴۲۴۲۸۲۱۱

پست الکترونیک: dr\_ahmadizadeh@yahoo.com  
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۸/۳۰  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۳۱

از بانک سلولی پاستور تهیه شده و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شد. سلول ها در داخل فلاکس حاوی ۹۰ سی سی محیط کشت RPMI1640 (Gipco)، امریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک (پنی سیلین  $\text{Lm}/\mu\text{g}$ ) و استریومایسین  $\text{Lm}/\mu\text{g}$ ) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس، سلول ها پاساز Seedind density داده شده و با توجه به محاسبات مربوط به مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانده شده و بعد از بررسی فلاکس مورد نظر توسط میکروسکوپ، در انکوباتور قرار گرفت [۱۶].

## روش کشت باکتری ترموفیلوس

مواد مورد استفاده برای کشت باکتری‌ها از شرکت تیتان بیوتک تهیه شدند. مقدار ۶۸ گرم از پودر آماده محیط در یک لیتر آب مقطر حل شده و سپس محیط مورد نظر توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. برای تهیه سوپرناتانت، باکتری‌های ترموفیلوس در محیط کشت (De Man, Rogosa and Sharpe agar) MRS مایع شدند و جهت کشت بهینه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت نگهداری از باکتری‌های ترموفیلوس از آن‌ها استونک تهیه گردید و در فریز -۸۰ درجه نگهداری شدند.

(Microculture tetrazolium test) MTT تست

اثر سایتو توکسیک باکتری روی سلول‌های سلطانی ذکر شده با روش رنگ‌سنجه و با استفاده از رنگ ترازو لیوم در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. آزمایش MTT که یک روش رنگ-سنجه است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ ترازو لیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژنان و تشکیل کریستال‌های آبی انجام می‌شود. در این روش، برخلاف سایر روش‌ها، مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند، حذف شده و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فوتمتر در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است. ابتدا تعداد مناسبی از سلول‌های ۱۰۰۰۰ HT29 در هر یک از چاهک‌ها کشت داده شده (۱۲۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ سلول در هر چاهک)، بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده و

برخی پروپیوتیک‌ها مکانیسم‌های ضد سرطانی را فعال می‌کنند. Altonsy و همکاران القاء مسیر میتوکندریابی آپوپتوز در سلول‌های کارسینومای کولونی انسان را با استفاده از پروپیوتیک‌هایی *Bifidobacterium lactis* و *Lactobacillus rhamnosus* مثل گزارش داده‌اند [۱۰]. هنوز روشن نیست که آیا پروپیوتیک‌ها توانایی مشابه در تحت تاثیر قرار دادن آپوپتوز در سلول‌های کولون نرمال انسانی را دارند یا خیر [۱۱]. سرطان‌های کلورکتال و معده به شیمی‌درمانی خیلی ضعیف پاسخ می‌دهند و چنانچه جراحی ممکن نباشد به یک پیش‌آگهی بدی متوجه خواهد شد [۱۲]. بنابراین، برای پیشگیری و یا درمان کمکی این نوع سرطان تحقیقات گسترده‌ای برای کاهش مقاومت به دارو و نیز کنترل رشد، متاستاز و آپوپتوز صورت می‌گیرد. بیان شده است که قادرند توان القایی آپوپتوز ۵-فلوروپوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال LS513 افزایش دهند و لذا پیشنهاد شده است که از این پروپیوتیک‌ها به عنوان ادجوانات در شیمی‌درمانی استفاده شود [۱۳]. نشان داده شده است که ترکیبی از پروپیوتیک (Resistant starch; RS) و *Bifidobacterium lactis* چشمگیری پاسخ آپوپتویک به یک کارسینوژن را در کولون انتهایی موش‌های صحرایی در یک بازه زمانی کوتاه بعد از مواجهه تسهیل می‌نماید [۱۴]. مرگ سلول‌های از نظر ژنومیک بی ثبات از طریق آپوپتوز یک فرایند تنظیمی مهم در برابر سرطانی شدن سلول‌ها است. همچنین، گزارش شده است که ترکیب RS و *B. lactis* به طور چشمگیری سلول‌ها را در برابر شکل گیری سرطان کلورکتال در مدل rat-azoxymethane حفاظت می‌نماید [۱۵]. سرطان در نتیجه تغییرات متعدد در چندین ژن مختلف به وقوع می‌پیوندد. از جمله ژن‌های مهمی که در سرطان کولون در گیرند می‌توان *PTEN* و *AKT1* را نام برد. ژن *PTEN* به عنوان بازدارنده تومور از طریق دسفریلاسیون ژن *AKT* عمل می‌کند. باکتری *Trichomonas vaginalis*-ترین پروپیوتیک دنیا و استارتر ماست می‌باشد. با وجود مصرف بالای این باکتری و ورود آن به روده انسان، هنوز هیچ مطالعه‌ای در مورد اثرات ضد سرطانی آن گزارش نشده است. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در کشت هم‌جوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با باکتری است تا کوکوکوس، تم مولیوس، می‌باشد.

مداد و روش‌ها

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی علوم پزشکی، تیریز در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی HT29

## استخراج RNA با ترایزول

برای استخراج RNA، به سلول‌های تیمار شده با باکتری ترایزول اضافه شد تا سلول‌ها لیز شوند. سپس، سلول‌های لیز شده به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتر منتقل شد. به تیوب‌ها حدود ۲۰۰ میکرو-لیتر کلروفرم اضافه شد، سروته گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰ RPM سانتریفیوژ شد و مایع رویی هر تیوب به تیوب‌های جدید منتقل گردید. سپس، به هر تیوب ۲/۵ برابر حجم نمونه ایزوپروپانول سرد افزوده شده، سروته گردیده، ۲۴ ساعت در ۷۰- قرار گرفت و سپس تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰ RPM سانتریفیوژ شده و مایع رویی بیرون ریخته شد. تیوب‌ها در دمای اتاق کاملاً خشک شده و در انتهای به تیوب‌ها ۲۰ میکرولیتر DEPC اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد [۱۷]. سپس، OD و غلظت آنها بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر با دستگاه نانودرایپ سنجیده شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNA‌های استخراج شده، ۵ نمونه به صورت تصادفی روی ژل آگاروز ۲ درصد برای ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ کاتروفورز شد.

## سترن cDNA

یک میکروگرم از RNA با ۰/۲ میکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولاو و آب DEPC مخلوط شده، با حرارت ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۵ واحد آنزیم RT (MMLV) ساخت شرکت Thermo Fisher بافر میکرولیتر (1x) buffer for MMLV RT و یک واحد بر میکرولیتر RNase افزوده شده و در انتها حجم کلی هر تیوب ۲۰ میکرولیتر شد. بعد تیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و به دستگاه برنامه: ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه داده شد تا cDNA ها سترن شوند [۱۸].

## طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار ۵ oligo طراحی و توسط وب‌سایت NCBI BLAST شدند (جدول شماره ۱). پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سترن شدند.

مقدار مناسبی از باکتری ترموفیلوس زنده به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت جهت تأثیر باکتری‌ها انکوبه شدند. OD باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است. میزان باکتری در OD1 برابر با  $8 \times 10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر است. این میزان برای OD2 برابر است با  $1/6 \times 10^9$ ، برای OD1.5 برابر است با  $1/2 \times 10^9$  و برای OD0.5 برابر است با  $4 \times 10^8$  سلول در هر میلی‌لیتر. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول‌تیمار نشده با باکتری به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس، پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (گلایسین M NaOH ۰/۱ M، ۰/۱ NaCl M pH=10.5) بهینه شده با ۳۷ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شدند. برای تعیین درصد زنده بودن، سلول‌ها سلول‌ها با تریپان بلو رنگ‌آمیزی شده، به این شکل که ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی سلول‌ها از زیر هود برداشته شده و داخل تیوب ۲ میلی‌لیتر ریخته شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر تریپان بلو به آن افزوده شده و به خوبی مخلوط گردید. در نهایت، با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد. میانگین به دست آمده ضرب در  $10^4$  و ضربی رقت گردیده تا تعداد سلول‌ها در یک میلی‌متر محلول به دست آمد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر سنجیده شد. درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور شد و درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفته بودند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به عنوان IC50 در نظر گرفته شد. این مقدار با استفاده از نرم‌افزار Excel از روی نمودار تعیین شد [۱۲].

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

(آمپلیکوون)	توالی (۵'->۳')	پرایمر	ژن
۱۶۱	CACACGACGGGAAGACAAGTT C	Forward	<i>PTEN</i>
	CCTCTGGCTCTGGTATGAAGAAT	Reverse	
۱۳۸	CTTCGTGAACATTAACGACAGGGC C	Forward	<i>AKT1</i>
	AATGCCACCCCTGACTAAGGAGTG G	Reverse	
۲۱۵	GAAGGTGAAGGTGGAGTC	Forward	<i>GAPDH</i>
	GAAGATGGTGATGGGATTTC	Reverse	

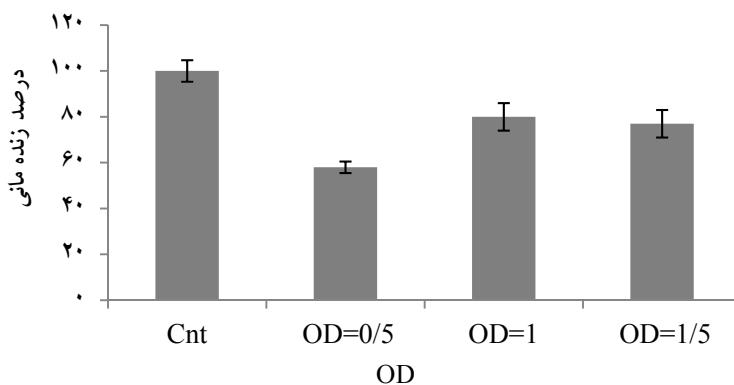
### آنالیز آماری داده‌ها

در مورد نتایج به دست آمده برای میزان بیان ژن‌ها، ابتدا های به دست آمده برای هر ژن توسط فرمول  $\Delta\Delta CT$  محاسبه گردید. سپس، میانگین نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد و نرمال بودن توزیع نتایج توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شده و برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. آزمون‌ها زمانی معنی دار در نظر گرفته شدند که مقدار  $P$  کمتر از ۰/۰۵ بود. نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن مرجع با فرمول زیر محاسبه شد:

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

### نتایج آزمایش MTT

این تست جهت پیدا کردن ۵۰ درصد کشندگی غلظت انجام شد. باکتری پس از رشد در OD های ۰/۰۵، ۱ و ۱/۵ رشد داده شد. بیشترین کشندگی در غلظت ۰/۰۵ برای باکتری ترموفیلیوس در ۴ ساعت بعد از تیمار به دست آمد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- نتیجه آزمایش MTT به منظور تعیین غلظتی از عصاره کشته شده باکتری که ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته باشد. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، غلظت  $OD=0/05$  بیشترین کشندگی در حداقل زمان را دارد که برای مطالعات مولکولی این غلظت مورد استفاده قرار گرفت ( $P=0/003$ ).

که میانگین OD نمونه‌ها  $550\text{ng}/\text{microL}$  و نسبت OD برابر با ۱/۹۸ بود. میزان بیان ژن‌های *AKT1* و *PTEN* در کشت هم‌جوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با باکتری استرپتوكوکوس ترموفیلیوس در نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است.

### Real-time RT- PCR

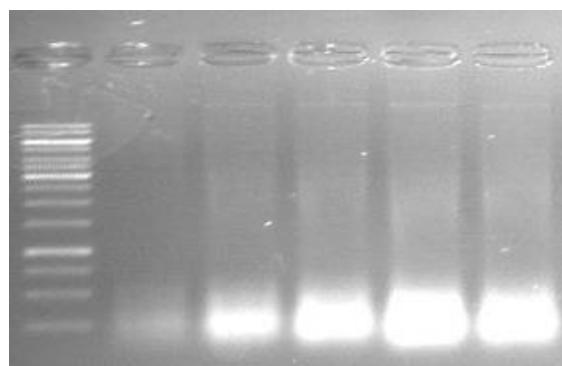
واکنش Real time PCR به صورت تکرارهای ۳ تابیه صورت گرفت؛ بدین‌شکل که در تیوب‌های مخصوص ۱ میکرو‌لیتر cDNA و ۱۹ میکرو‌لیتر مستر میکس سایبر‌گرین حاوی ۱ میکرو‌لیتر از هر کدام از پرایمرها (۰/۰۲ میکرومولار)، ۷ میکرو‌لیتر DEPC و ۱۰ میکرو‌لیتر Mastermix ۱x Real time PCR قرار داده شد. شده و سپس تیوب‌ها در دستگاه Real time PCR قرار داده شد. لازم به ذکر است که با رقت سازی یک از نمونه‌ها، منحنی رسم گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲- برنامه دمایی Real time PCR ژن‌های مورد مطالعه

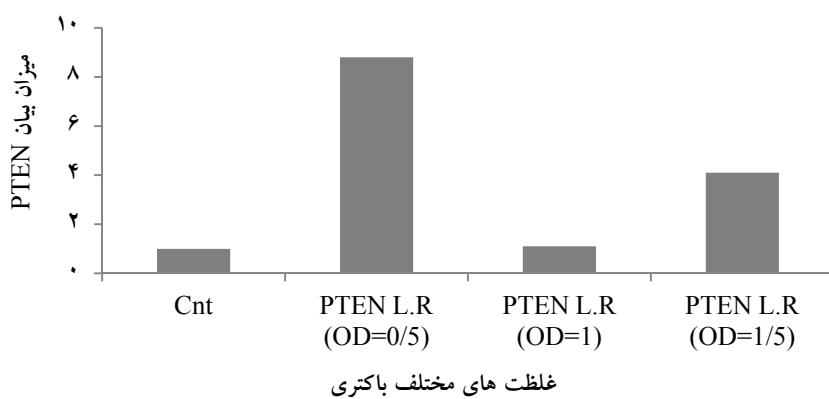
تعداد سیکل	زمان	دما	
۱	۱۰ دقیقه	۹۴°C	جد اشدن اولیه
	۱۵ ثانیه	۹۴°C	جدا شدن
۴۰	۳۰ ثانیه	( <i>PTEN</i> =۶۰، <i>AKT1</i> =۶۹)	جفت شدن
	۲۵ ثانیه	۷۲°C	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲°C	طویل شدن نهایی

### استخراج RNA

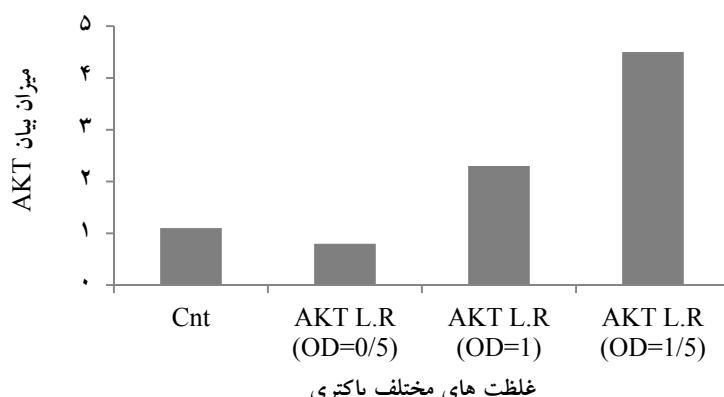
نمونه‌های کنترل و تیمار شده به منظور ارزیابی RNA کمیت و کیفیت الکتروفورز گردید. تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد که استخراج RNA به خوبی انجام شده و برای سنتز cDNA مناسب می‌باشد. به منظور اطمینان از نتایج الکتروفورز و همچنین کنترل کمی، RNAهای استخراج شده با نانودرایپ ارزیابی شدند.



تصویر شماره ۱- ارزیابی RNA استخراج شده از نمونه‌های کنترل (Cnt) و نمونه‌های تیمار شده با عصاره باکتری ترموفیلوس



نمودار شماره ۲- میزان بیان *PTEN* در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده



نمودار شماره ۳- میزان بیان *AKT1* در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده

پذیری عضلانی، پاسخ آسیب DNA، آنزیوژن و قطیبت سلولی اثر می‌گذارد. همانگ با توانایی آن برای اثرگذاری بر فرآیندهای چندگانه اصلی سلولی، *PTEN* نقش مهمی را در پاتوژن چندگانه بیماری مانند دیابت، اوتیسم و تقریباً همه سرطان‌ها بازی می‌کند [۱۹]. سیگنال‌دهی از طریق آبشار PI3K/*PTEN*/*AKT1*/mTOR عامل متعادل کننده بقای سلول و آپوپتوز می‌باشد. همچنین، بیان شده است که لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوپاسیلوس کازسینی می‌توانند سبب افزایش القای آپوپتوز در رده سلولی کارسینو-

### بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های ترموفیلوس میزان بیان ژن‌های *AKT1* را کاهش داده و بیان *PTEN* را افزایش داده است. این تغییرات در جهت کشانده شدن سلول‌های سرطانی به سمت آپوپتوز می‌باشد. Parsons و Keniry نشان داده‌اند که *PTEN* یک ژن زائد نبوده و به صورت تکاملی صفاتی را حفظ کرده است که عملکرد آن بر پیش‌رفت سلولی معکوس نظیر رشد چرخه سلولی، تکثیر سلولی، کموتاکسی، آپوپتوز، پیری، انقباض

داد که *PTEN* به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی مسیر سیگنالینگ *PI3K/AKT1* عمل می‌کند و هدف پروتئین‌های تنظیمی که در سرطان تحت تأثیر قرار می‌گیرند، هستند. بنابراین، آسیب تنظیم‌کننده‌های *PTEN* ممکن است مسیرهای انکوژنیک دیگری را در *PTEN* کنار مسیر *PI3K/AKT1* تحت تأثیر قرار دهد. درواقع تنها به عنوان مهارکننده این مسیر محسوب نمی‌شود، بلکه از طریق میان‌کنش پروتئین-پروتئین، دیگر مسیرهای رشد را نیز مهار می‌کند و بنابراین به عنوان اصلی‌ترین عامل مهارکننده سیگنالینگ محسوب می‌شود [۱۹].

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های ترموفیلوس میزان بیان ژن‌های *AKT1* و *PTEN* را در سلول‌های سرطانی کولون HT29 به ترتیب کاهش و افزایش داده و در مجموع این تغییرات در بیان ژن‌ها در جهت سوق دادن سلول‌های سرطانی به سمت آپوپتوز است. بنابراین از باکتری‌های ترموفیلوس می‌توان جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی‌خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر و یا به عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره جست.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم شیوا ستاری با کد ۱۴۴۳۰۵۱۳۹۵۱۰۰۵ دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب می‌باشد.

### References:

- [1] Kich DM, Vincenzi A, Majolo F, Volken de Souza CF, Goettlert MI. Probiotic: nutrition in cancer treatment and prevention. *Nutr Hosp* 2016; 29; 33(6): 1430-7.
- [2] Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Benef Microbes* 2015; 6(2): 209-17.
- [3] Whelan K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14(6): 581-7.
- [4] Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin Ther* 2008; 30(3): 453-68.
- [5] Gertler R, Rosenberg R, Schuster T, Friess H. Defining a high-risk subgroup with colon cancer stages I and II for possible adjuvant therapy. *Eur J Cancer* 2009; 45(17): 2992-9.
- [6] Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, et al. Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res* 2000; 60(24): 6935-41.

- [7] Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Schouten LJ, Koedijk FD, Roemen GM, et al. Fat and Kras mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2004; 25(9): 1619-28.
- [8] Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 1991; 51(5): 1564-7.
- [9] Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liou MT. The improvement of hypertension by probiotics: effect on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci* 2009; 10(9): 3755-75.
- [10] Altonsy MO, Andrews SC, Tuohy KM. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. *Int J Food Microbiol* 2010; 137(2-3): 190-203.
- [11] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8): 573-84.
- [12] Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. Cytotoxicity and antimicrobial assessment of Euphorbia hebecarpa. *Iran J Pharm Res* 2004; 3(2): 75-82.
- [13] Roberfroid MB. Probiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br J Nutr* 1998; 80(4): S197-202.
- [14] Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis* 2010; 31(2): 246-51.
- [15] Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A, et al. A Synbiotic Combination of Resistant Starch and *Bifidobacterium lactis* Facilitates Apoptotic Deletion of Carcinogen-Damaged Cells in Rat Colon. *J Nutr* 2005; 135(5): 996-1001.
- [16] Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 1989; 92(Pt 3): 513-8.
- [17] Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; 577 (Pt 1): 433-43.
- [18] Peterson SM, Freeman JL. RNA Isolation from Embryonic Zebrafish and cDNA Synthesis for Gene Expression Analysis. *J Vis Exp* 2009; (30). pii: 1470.
- [19] Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008 Sep 18;27(41):5477-85.
- [20] Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutr Cancer* 2010; 62(3): 371-8.
- [21] Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 2009; 20(6): 598-602.
- [22] Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, et al. *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004; 69(4): 225-8.s
- [23] Chan WK, Cheung CC, Law HK, Lau YL, Chan GC. *Ganoderma lucidum* polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immuno-stimulatory function. *J Hematol Oncol* 2008; 1: 9.
- [24] Mair C, Plitzner C, Pfaffl MW, Schedle K, Meyer HH, Windisch W. Inulin and probiotics in newly weaned piglets: effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. *Arch Anim Nutr* 2010; 64(4): 304-21.
- [25] Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol* 2014; 20(42): 15632-49.