Original Article

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[2*]

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

بررسی میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در کشت همجوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*

شیوا ستاری [۱]، چنگیز احمدی‌زاده [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان کولون از سرطان‌های رایج در جهان می‌باشد. 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 لوسیون‌ها 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 همجوار باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* با سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌باشد.

مواد روش‌ها: از کشت باکتری‌ها، مایع رویی و عصاره باکتریایی تهیه شده سلول‌های سرطانی کولون HT29 توسط این مواد تیمار شدند. نکروز سلولی با روش MTT بررسی گردید. همچنین، میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در رده سلولی HT29 با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: باکتری *استرپتوکوکوس 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 OD =۰/۰۵ بیشترین کشندگی طی ۴ ساعت را دارد.

نتیجه‌گیری: می‌توان از باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* جهت ایجاد یک راه‌کار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی-خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر و یا به‌عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره برد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، سرطان کولون، سلول HT29

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

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 به‌خود اختصاص داده است [۱]. در آزمایش‌های برون‌تنی نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها در سرکوب زخم اولیه نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ نقش دارند [۲]. اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیب میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد [۳]. همچنین، یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها ازجمله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضد تکثیری سلول‌های سرطانی ازجمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است [۴].

سرطان کولون اغلب به شکل پولیپ در سطح جداره داخلی روده ایجاد می‌شود که منشا آن پوشش داخلی روده بزرگ است. این توده‌ها معمولا غیرسرطانی هستند، ولی اگر درمان نشوند، ممکن است به سرطان کولون تبدیل شوند [۵]. عوامل مختلف مثل عوامل ژنتیکی، محیطی و رژیم غذایی می‌توانند به‌عنوان عامل سرطان روده بزرگ درنظر گرفته شوند [۷،۶]. نشان داده شده است که عوامل پیش‌نئوپلاستیک در کولون افراد مبتلا به سرطان کولون وجود دارند. شواهد نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به-عنوان عوامل پیشگیری و تسکین علایم سرطان کولون داشته باشند [۸]. بیشتر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان می‌باشند و در آن‌جا ژندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند. معمول‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی 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، استرپتوکوکوس و *اشریشیا کلای* نیز برای این منظور استفاده می‌شوند. از مخمرها نیز *ساکارومیسس سروزیزیه* و *ساکارومیسس بولاردی* را می‌توان به‌عنوان پروبیوتیک نام برد [۹]. در زمینه درمان بیماری التهاب روده‌ای توسط پروبیوتیک‌ها نتایج امیدبخشی حاصل شده است. علاوه بر تنظیم هومئوستازی اپی‌تلیال روده و پاسخ‌های ایمنی،

[۱] گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی بناب، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

اهر، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی اهر

تلفن: ۰۹۱۰۴۰۳۰۴۶۴ **دورنویس:** ۰۴۱۴۴۲۲۸۲۱۱

پست الکترونیک: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۳۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۸/۳۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

برخی پروبیوتیک‌ها مکانیسم‌های ضد سرطانی را فعال می‌کنند. Altonsy و همکاران القاء مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در سلول‌های کارسینومای کولونی انسان را با استفاده از پروبیوتیک‌هایی مثل *Lactobacillus rhamnosus* و *Bifdobacterium lactis* گزارش داده‌اند [۱۰]. هنوز روشن نیست که آیا پروبیوتیک‌ها 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 منتج 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 *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* قادرند توان القایی آپوپتوز ۵-فلورویوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال LS513 افزایش دهند و لذا پیشنهاد شده است که از این پروبیوتیک‌ها به‌عنوان ادجوانت در شیمی‌درمانی استفاده شود [۱۳]. نشان داده شده است که ترکیبی از پروبیوتیک *Bifdobacterium lactis* و (Resistant starch; RS) به‌طور چشم‌گیری پاسخ آپوپتوتیک 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 بی‌ثبات از طریق آپوپتوز یک فرایند تظیمی مهم در برابر سرطانی شدن سلول‌ها است. همچنین، گزارش شده است که ترکیب RS و *B. lactis* به‌طور چشمگیری سلول‌ها را در برابر شکل‌گیری سرطان کلورکتال در مدل rat-azoxymethane حفاظت می‌نماید [۱۵]. سرطان در نتیجه تغییرات متعدد در چندین ژن مختلف به‌وقوع می‌پیوندد. از جمله ژن‌های مهمی که در سرطان کولون درگیرند می‌توان *PTEN* و *AKT1* را نام برد. ژن *PTEN* به‌عنوان بازدارنده تومور از طریق دفسفریلاسیون ژن *AKT* عمل می‌کند. باکتری ترموفیلوس تجاری‌ترین پروبیوتیک دنیا و استارتر ماست می‌باشد. باوجود 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 *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی HT29 از بانک سلولی پاستور تهیه شده و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. سلول‌ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI1640 (Gipco، امریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین µg/µL ۰/۱ و استرپتومایسین µg/µL ۰/۱) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس، سلول‌ها پاساژ داده شده و باتوجه به محاسبات مربوط به Seedind density 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 فلاسک 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 به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. برای تهیه سوپرناتانت، باکتری‌های ترموفیلوس در محیط کشت مایع MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) کشت داده شدند و جهت کشت بهینه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جهت نگهداری از باکتری‌های ترموفیلوس از آن‌ها استوک تهیه گردید و در فریز ۸۰- درجه نگهداری شدند.

تست MTT (Microculture tetrazolium test)

اثر سایتوتوکسیک باکتری روی سلول‌های سرطانی ذکر شده با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از رنگ تترازولیوم در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. آزمایش MTT که یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز 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 فتومتر در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است. ابتدا تعداد مناسبی از سلول‌های HT29 در هریک از چاهک‌ها کشت داده شده (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک)، بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

مقدار مناسبی از باکتری ترموفیلوس زنده به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت جهت تأثیر باکتری‌ها انکوبه شدند. OD باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است. میزان باکتری در OD1 برابر با ۸×۱۰^{۹} سلول در هر میلی‌لیتر است. این میزان برای OD2 برابر است با $۱/۶\times۱۰^{۹}$، برای OD1.5 برابر است با $۱/۲\times۱۰^{۹}$ و برای OD0.5 برابر است با ۴×۱۰^{۸} 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 میکرو لیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول تیمار نشده با باکتری به‌عنوان کنترل به‌کار برده شدند. سپس، پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به‌همراه ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (گلایسین M ۰/۱، Nacl M ۰/۱ دارای pH=10.5 بهینه شده با M NaOH ۱) جایگزین گردید. سپس، پلیت‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای 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 به‌خوبی مخلوط گردید. در نهایت، با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد. میانگین به‌دست آمده ضرب‌در ۱۰۴ و ضریب رقت گردیده تا تعداد سلول‌ها در یک میلی‌متر محلول به‌دست 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 ضرب‌در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به‌عنوان IC50 در نظر گرفته شد. این مقدار با استفاده از نرم‌افزار Excel از روی نمودار تعیین شد [۱۲].

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، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰RPM 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 ۱۲۰۰۰RPM سانتریفیوژ شده و مایع رویی بیرون ریخته شد. تیوب‌ها در دمای اتاق کاملا خشک شده و در انتها 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 نانودراپ سنجیده شد. به‌منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده، ۵ نمونه به‌صورت تصادفی روی ژل آگاروز ۲ درصد برای ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد.

سنتز cDNA

یک میکروگرم از RNA با ۰/۲ میکرومولار هگزامر پرایمر و ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰میلی‌مولار و آب DEPC مخلوط شده، با حرارت ۶۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۵ واحد آنزیم RT (MMLV) ساخت شرکت Thermo Fisher، بافر buffer for MMLV RT (1x) و یک واحد بر میکرولیتر مهارگر 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 سنتز شوند [۱۸].

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار oligo 5 طراحی و توسط وب‌سایت NCBI، BLAST شدند (جدول شماره ۱). پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

ژن	پرایمر	توالی (3′–>5′)	آمپلیکون (bp)
PTEN	Forward	CACACGACGGGAAGACAAGTTC	۱۶۱
	Reverse	CCTCTGGTCCTGGTATGAAGAAT	
AKT1	Forward	CTTCGTGAACATTAACGACAGGGC C	۱۳۸
	Reverse	AATGGCCACCCTGACTAAGGAGTG G	
GAPDH	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	۲۱۵
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC	

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

Real-time RT- PCR

واکنش Real time PCR به‌صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت؛ بدین‌شکل که در تیوب‌های مخصوص ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۹ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (۰/۲ میکرومولار)، ۷ میکرولیتر DEPC و ۱۰ میکرولیتر Mastermix 1x Real time ریخته شده و سپس تیوب‌ها در دستگاه Real time PCR قرار داده شد. لازم به‌ذکر 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
۴۰	۱۵ ثانیه	۹۴°C	جدا شدن
	۳۰ ثانیه	(*PTEN*=۶۰, =۶۳, AKT1=۶۹)	جفت شدن
	۲۵ ثانیه	۷۲ °C	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲°C	طویل شدن نهایی

آنالیز آماری داده‌ها

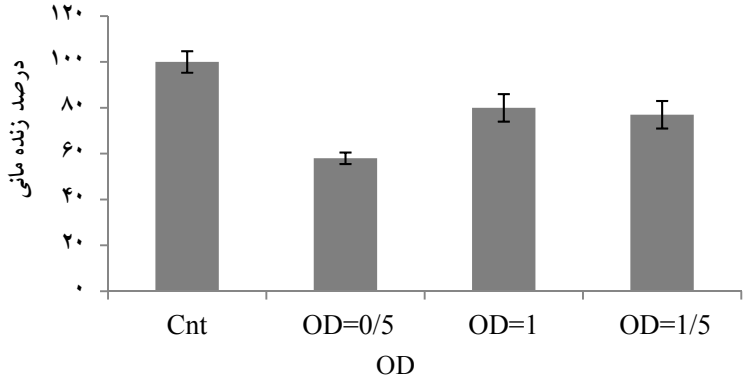
در مورد نتایج به‌دست آمده برای میزان بیان ژن‌ها، ابتدا CTهای به‌دست آمده برای هر ژن توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. سپس، میانگین نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد و نرمال بودن توزیع نتایج توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شده و برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. آزمون‌ها زمانی معنی‌دار در نظر گرفته شدند که مقدارP کمتراز ۰/۰۵ بود. نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن مرجع با فرمول زیر محاسبه شد:

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

نتایج

آزمایش MTT

این تست جهت پیدا کردن ۵۰ درصد کشندگی غلظت انجام شد. باکتری پس از رشد در ODهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ رشد داده شد. بیشترین کشندگی در غلظت ۰/۵ برای باکتری ترمو-فیلیوس در ۴ ساعت بعد از تیمار به‌دست آمد (نمودار شماره ۱).

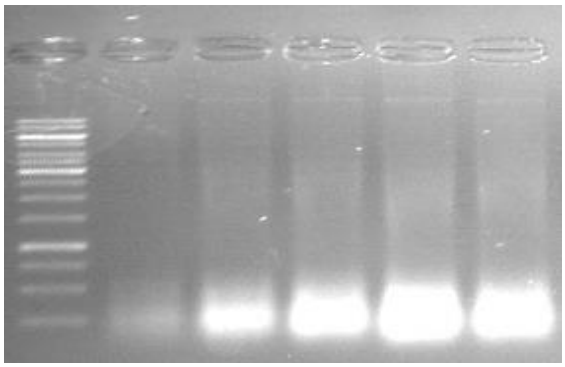


نمودار شماره ۱- نتیجه آزمایش MTT به‌منظور تعیین غلظتی از عصاره کشته شده باکتری که ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته باشد. همان‌طور که در شکل نشان-داده شده است، غلظت OD=۰/۵ بیشترین کشندگی در حداقل زمان را دارد که برای مطالعات مولکولی این غلظت مورد استفاده قرار گرفت (*P*= ۰/۰۰۳).

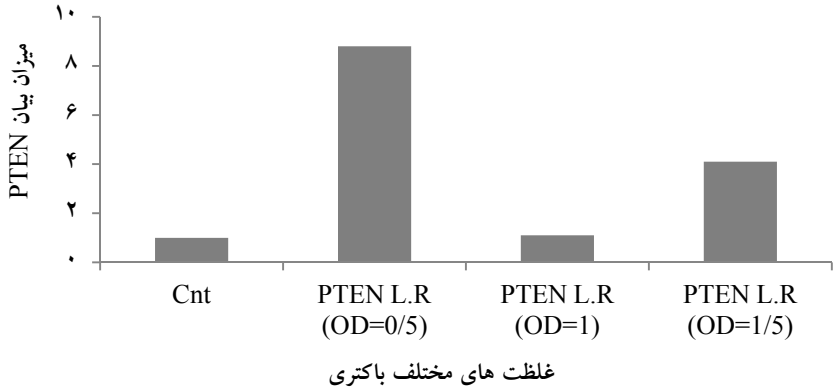
استخراج RNA

RNA نمونه‌های کنترل و تیمار شده به‌منظور ارزیابی کمیت و کیفیت الکتروفورز گردید. تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد که استخراج RNA به‌خوبی انجام شده و برای سنتز cDNA مناسب می‌باشد. به‌منظور اطمینان از نتایج الکتروفورز و همچنین کنترل کمی، RNAهای استخراج شده با نانودراپ ارزیابی شدند که میانگین OD نمونه‌ها ۵۵۰ng/ microL (۸۳۰ng-۲۲۰) و نسبت OD برابر با ۱/۹۸ بود. میزان بیان ژن‌های *PTEN* و *AKT1* در کشت هم‌جوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با باکتری *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است.

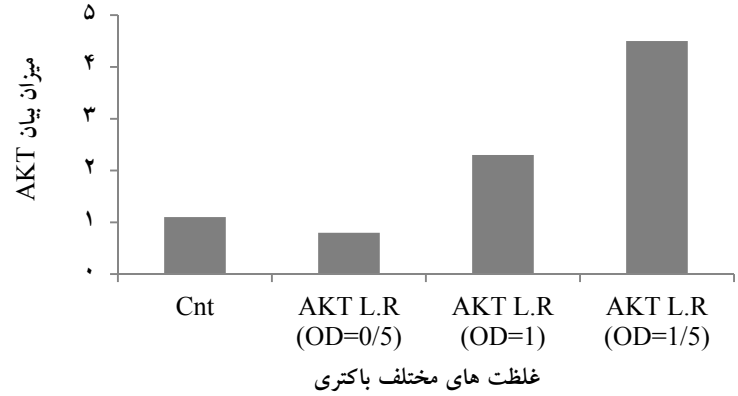
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]



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

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. Keniry و Parsons نشان داده‌اند که *PTEN* یک ژن زائد نبوده و به‌صورت تکاملی صفاتی را حفظ کرده است که عملکرد آن بر پیش‌رفت سلولی معکوس نظیر رشد چرخه سلولی، تکثیر سلولی، کموتاکسی، آپوپتوز، پیری، انقباض پذیری عضلانی، پاسخ آسیب DNA، آنژیوژنز و قطبیت سلولی اثر می‌گذارد. هماهنگ با توانایی آن برای اثرگذاری بر فرآیندهای چندگانه اصلی سلولی، *PTEN* نقش مهمی را در پاتوژنز چندین بیماری مانند دیابت، اوتیسم و تقریبا 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 *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازیی* می‌توانند سبب افزایش القای آپوپتوز در رده سلولی کارسینو-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

مای LS315 شوند و می‌توانند به‌عنوان ادجوانت با شیمی‌درمانی به‌کار گرفته شوند [۲۰]. مطالعه Pan و همکاران نشان داد که سلول لاکتوباسیلوس کشته شده توسط حرارت، تاثیر مهاری بر بقای سلول‌های سرطانی روده و سینه دارد [۲۱]. بنابراین، می‌توان گفت که باکتری‌های کشته شده و سوپرناتانت آنها در مقایسه با سلول‌های زنده نیز می‌توانند اثرات ضد سرطانی داشته باشند که یکی از مکانیسم‌ها کاهش نفوذپذیری روده است [۲۲]. Chan و همکارانش اثرات تجویز دهانی باکتری *Lactobacillus acido-philus* را روی سرطان‌های کولورکتال موش‌ها تجزیه و تحلیل نمودند. نتایج ایشان دلالت بر آن داشت که باکتری مذکور شدت کارسینوژنز کولورکتال را کاهش داده و از طرفی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در موش‌های تیمار شده افزایش می‌دهد [۲۳]. مسیر *PTEN/AKT1* اصلی‌ترین مسیر برای حفظ بقا است که در سرطان فعال می‌شود. تلاش‌ها برای توسعه درمان‌های هدف‌مند کاملا موفق نبوده‌اند که عمده علت آن به حلقه‌های فیدبک منفی درون مسیر داخلی گسترده یا درون مسیر خارجی به شبکه‌بندی بین بازدارنده‌های مسیر باز می‌گردد. بازدارنده تومور *PTEN* ترمز اصلی مسیر بوده و هدفی مشترک برای غیرفعال سازی سرطان‌های سوماتیک است. Mair و همکاران نشان داده‌اند که تجویز ۴ هفته‌ای مخلوط پروبیوتیک‌های *Enterococcus faecium*، *Lacto-bacillus salivarius*، *Lactobacillus reuteri* و *Bifidoba-cterium thermophilum* سبب افزایش بیان *TGF-β* و *CDK-4* و *NF-κB* در کلون می‌گردد [۲۴]. پروبیوتیک‌ها عملکرد خود را از طریق برهم‌کنش با سلول‌های روده انجام می‌دهند و سیستم ایمنی روده را با تاثیر بر بیان ژن این سلول‌ها، تنظیم می‌کنند. عملکرد آنها بستگی به سویه باکتری دارد، و عمدتا پاسخ قابل تحملی را به آنتی‌ژن‌های خارجی با برهم‌کنش با گیرنده‌های شبه Toll (TLR: Toll-like receptor) و کاهش بیان NF-κB و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی القا می‌کنند [۲۵]. این مطالعه نشان داد که *PTEN* به‌عنوان 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 کنار مسیر *PI3K/AKT1* تحت تأثیر قرار دهد. درواقع *PTEN* تنها به‌عنوان مهارکننده این مسیر محسوب نمی‌شود، بلکه از طریق میان‌کنش پروتئین–پروتئین، دیگر مسیرهای رشد را نیز مهار می‌کند و بنابراین به‌عنوان 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 به‌ترتیب 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 به‌عنوان 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, Goettert 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 Micro bes*** 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 probio tics 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]

[7] Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Schouten LJ, Koedijk FD, Roemen GM, et al. Fat and K-ras 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, Liong 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 Euphoria hebecarpa. ***Iran J Pharm Res*** 2004; 3(2): 75-82.
[13] Roberfroid MB. Perbiotics and synbiotics: concepts and nutriionl propertices**.** ***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 colorectalcancer 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 Colon1. ***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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-08]