Original Article

The effect of combination of *Lactobacillus reuteri* and Coumarin on the inhibition of gastric cancer cells, AGS cell line

Fouman-Ajirlou P[1], Ahmadizadeh Ch[2*], Zaeefizadeh M[3]

1- Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, I.R. Iran.
2- Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, I.R. Iran.
3- Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardebil, I.R. Iran.

Received: 2019/07/21 | Accepted: 2020/05/2

Abstract:

Background: *Lactobacillus reuteri* has broad-spectrum effects on both gram-positive and negative bacteria as well as fungi and protozoa. Also, Coumarins have high ability to control and treat cancer. Apoptosis is a planned cell death that plays an essential role in the development and homostasis of living creatures. Bax and Bcl2 genes are among key target genes of internal pathway; thus the present study aimed to determine the effect of *L. reuteri* and Coumarin on the expression of these two genes on AGS cell line.

Materials and Methods: After cultivation of gastric cancer cells, Coumarin and *L. reuteri* were affected in these concentrations at different concentrations and the inhibitory effect on cell proliferation was evaluated using the MTT method. Afterwards, the RNA content of cells was extracted using an RNA extraction kit. Then the cDNA was synthesized for Bax and Bcl2 genes and finally Real time PCR was run.

Results: The results of the MTT assay on gastric cancer cells showed the inhibitory effect of Coumarin and *L. reuteri.* Also, the results of Real Time PCR showed that the expression of Bax and Bcl2 expression in comparison with the control group was significantly increased.

Conclusion: Considering the effects of Coumarin and *L. reuteri* on inhibiting proliferation of AGS cells and increasing the Bax and Bcl2 gene, it can be concluded that Coumarin and *L. reuteri* can induce apoptosis in cancerous cells by affecting the expression of genes involved in apoptosis.

Keywords: Stomach cancer, *Lactobacillus reuteri*, Coumarin

***Corresponding Author:**
Email: ch_ahmadizadeh@iau_ahar.ac.ir
Tel: 0098 910 403 0464
Fax: 0098 414 422 8211

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2020; Vol. 24, No 2, Pages 122-132

Please cite this article as: Fouman-Ajirlou P, Ahmadizadeh Ch, Zaeefizadeh M. The effect of combination of *Lactobacillus reuteri* and Coumarin on the inhibition of gastric cancer cells, AGS cell line. ***Feyz*** 2020; 24(2): 122-32.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

بررسی تأثیر ترکیب *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین بر روی مهار سلول‌های سرطانی معده رده‌ی سلولی AGS

پریسا فومن اجیرلو [۱]، چنگیز احمدی‌زاده [*۲]، محمّد ضعیفی‌زاده [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: *لاکتوباسیلوس روتری*، اثراتی با طیف گسترده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی؛ و همچنین قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها دارد. کومارین‌ها از توانایی بالا برای مهار و درمان سرطان برخوردار هستند. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌باشد که در رشد و نمو و هموستازی موجودات زنده نقش اساسی ایفا می‌کند. ژن Bax و Bcl2 از جمله ژن‌های کلیدی در مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشند و این مطالعه به‌منظور تعیین اثر کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* بر بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl2 بر رده‌ی سلولی AGS انجام شد.

مواد و روش‌ها: پس از کشت سلول‌های سرطان معده، کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* در غلظت‌های مختلف بر این سلول‌ها تأثیر داده شد و اثر مهارکنندگی بر تکثیر سلولی با استفاده از روش (MTT) مورد ارزیابی قرار گرفت. RNA سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA تخلیص شد و در نهایت پس از ساخت cDNA، بیان دو ژن مرتبط با آپوپتوز با واکنش Real time PCR تعیین گردید.

نتایج: نتایج حاصل از روش MTT بر سلول‌های سرطان معده، خاصیت مهارکنندگی کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* را نشان داد. همچنین نتایج حاصل از آزمون Real time PCR مشخص کرد که میزان بیان ژن Bax و Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* در مهار تکثیری سلول‌های AGS و افزایش ژن Bax و Bcl2 می‌توان نتیجه گرفت که کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* می‌توانند با تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شوند.

واژگان کلیدی: سرطان معده، *لاکتوباسیلوس روتری*، کومارین

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۲، خرداد و تیر۱۳۹۹، صفحات ۱۳۲-۱۲۲

مقدمه

سرطان معده به سرطانی گفته می‌شود که منشأ شروع آن از معده است [۱]. سرطان معده از دسته سرطان‌هایی است که طی سالیان و به آرامی رشد می‌کند. قبل از این‌که سرطان به‌معنای واقعی ظاهر شود، تغییراتی در لایه‌های معده ایجاد می‌شود. در حدود ۸۵ درصد از سرطان‌های معده را آدنوکارسینوم‌ها و ۱۵ درصد آن‌ها را لنفوم‌ها و تومورهای استرومایی معدی – روده‌ای و لیومیوسارکوم تشکیل می‌دهند [۳،۲]. سرطان در کشورهای توسعه‌یافته و در حال‌توسعه به‌ترتیب اوّلین و دومین عامل مرگ می‌باشد. سرطان معده در جهان به‌عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود [۴].

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۰۴۰۳۰۴۶۴ **دورنویس:** ۰۴۱۴۴۲۲۸۲۱۱

پست الکترونیک: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۳۰ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۲/۱۳

سرطان معده یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سرتاسر جهان می‌باشد. شیوع این سرطان، ناشی از فرآیند ایجاد بافت سرطانی در معده، چند مرحله دارد و جزء بیماری‌های چند عاملی دسته‌بندی می‌شود و دلیل آن هم ایجاد سرطان بر اثر وجود عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی در افراد می‌باشد [۶،۵]. بر اساس آمار سال ۲۰۰۵، بیشترین موارد این سرطان در کشورهای ژاپن، چین و روسیه مشاهده شده است و کمترین موارد آن نیز مربوط به کشورهای توسعه‌یافته غربی می‌باشد [۷]. بالاترین میزان بروز سرطان معده در ایران، از استان اردبیل گزارش شده است [۸]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد سرطان‌های معده، تک‌گیر و ۱۰ تا ۲۰ درصد، خانوادگی و حدود ۱ تا ۳ درصد موارد آن، ژنتیکی می‌باشد. عوامل محیطی و ارثی در سرطان معده دخیل است. مهم‌ترین عوامل خطر سرطان معده شامل باکتری هلیکوباکترپیلوری، رژیم غذایی سرشار از نمک، چربی و عدم مصرف کافی میوه‌جات و سبزیجات، سیگار کشیدن و فاکتورهای ژنتیکی می‌باشند [۹،۷]. پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفید درون سیستم گوارشی هستند که دارای اثرات مفید زیادی می‌باشند و نقش مهمّی در تعدیل سیستم گوارشی و سیستم ایمنی دارند [۱۰]. این میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات تحریک‌کنندگی و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

تقویت‌کنندگی روی سیستم ایمنی می‌باشند [۱۱]. امروزه، لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها بیشترین باکتری‌هایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند [۱۲]. در بین لاکتوباسیل‌ها، *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. *لاکتوباسیلوس روتری* جزء گسترده‌ترین گونه‌های لاکتوباسیل در حیوانات و محدودترین گونه‌ها در روده انسان محسوب می‌شود [۱۴،۱۳]. در حال حاضر فعالیت وسیع ضدّمیکروبی *لاکتوباسیلوس روتری* به‌عنوان مهم‌ترین عامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت‌ها مطرح است [۱۵]. این باکتری باعث ایجاد ترکیب ضدّمیکروبی همچون ruterin یک ترکیب ((-3 β-hydroxypropionaldehyde(HPA) می‌شود که در اثر تخمیر گلیسرول در شرایط بی‌هوازی تولید می‌گردد و اثراتی با طیف گسترده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها دارد [۱۷،۱۶]. کومارین‌ها (شناخته‌شده به‌عنوان 2, 1-benzopyrone یا O-hydroxycinnamic acid-8-lactones) از یک گروه بزرگ مشتقات فنولیک تشکیل شده‌اند که در گیاهان یافت می‌شوند. این گروه متشکل از حلقه‌های benzene و pyrone هستند [۱۸]. کومارین و مشتقات آن از لحاظ زیستی بسیار فعال می‌باشند. این ترکیبات به‌علت اثر ضدّباکتریایی [۱۹]، ضدّانعقادی و گشادکنندگی عروق [۲۰]، ضدّ جهش‌زایی [۲۱]، مهار لیپوکسیژناز و سیکلواکسیژناز [۲۳،۲۲]، مهار اکسیژن فعال و ضدّتوموری [۲۵،۲۴] حائز اهمیت زیستی می‌باشند. همچنین به‌خاطر اهمیت زیاد کومارین‌هایی مانند پرنیل کومارین‌ها و اکسی‌کنتنیل کومارین‌ها به‌عنوان مواد ضدّالتهاب، محققان این ترکیبات طبیعی را جداسازی و مشتقات آن‌ها را سنتز نموده‌اند [۲۸-۲۶]. یکی از مشتقات پرنیله کومارین‌ها به نام (۷-farnesyloxycoumarin umbelliprenin) در گونه‌های گیاهی مختلفی، مانند کرفس، ferula، *Angelica archangelic*، *Corandrum Sativum* و *Citrus limon* یافت می‌شود. مطالعات نشان دادند که این ترکیب دارای اثر ضدّسرطان می‌باشد [۲۹]. هدف از این تحقیق، مطالعه تأثیر باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین در رشد، متاستاز و آپوپتوزیز سلول‌های سرطانی معده AGS در جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین و هزینه کمتر؛ و یا به‌عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان معده بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی - مقطعی می‌باشد و در معاونت پژوهشی علوم پزشکی واحد اردبیل، در سال ۱۳۹۷ انجام شده است. برای این مطالعه از رده‌ی سلولی سرطانی AGS موجود در دانشگاه اردبیل استفاده شد. سلول‌ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI1640 (Gipco، آمریکا) غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰ ماکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین µg/µL ۰/۱ و استرپتومایسین µg/µL ۰/۱) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شدند. سپس سلول‌ها پاساژ داده شدند و با شمارش آن‌ها و با توجه به محاسبات مربوط به Seedind density موردنظر برای انجام آزمایشات، مقدار موردنیاز از سوسپانسیون سلولی توسط محیط کشت کامل به حجم موردنظر رسید و بعد از بررسی فلاسک موردنظر توسط میکروسکوپ، در انکوباتور قرار گرفت.

تست Microculture Tetrazolium Test : MTT

اثر متابولیسم ثانویه *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین بر روی سلول‌های سرطانی رده AGS با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از رنگ ترازولیوم با نام شیمیایی-3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-dipheny Tetrazolium bromide که به‌اختصار MTT نامیده می‌شود، در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. آزمایش MTT یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیاشدن و شکسته‌شدن کریستال‌های زردرنگ ترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,-diphenyltetrazolium bromide به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی انجام می‌شود. ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰ سلول از سلول‌های AGS در هر یک از چاهک‌ها کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین و ترکیب *لاکتوباسیلوس* و کومارین به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. به‌جای *لاکتوباسیلوس روتری* از قرص پایلوشات که حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* غیرزنده ۱۰۰ میلی‌گرم است و از بانک تخصصی محصولات داروخانه خریداری شده بود، استفاده شد. پایلوشات با جرم‌های متفاوت به چاهک‌های حاوی سلول با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و چاهک‌ها به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس تأثیرات غلظت‌های مختلف پایلوشات با استفاده از سنجش MTT ارزیابی شد. کومارین از شرکت آفرینش یاخته تهیه گردید. پودر کومارین را در آب مقطر به غلظت‌های مختلف رسانده، کومارین با غلظت‌های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵/۵

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

ماکروگرم در ماکرولیتر به چاهک‌های حاوی سلول با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. از هر غلظت کومارین و *لاکتوباسیلوس* در ۳ چاهک تکرار صورت گرفت. پس از این مدت انکوباسیون، محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شد و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل‌شده در PBS) جایگزین شد. سلول تیمارنشده با باکتری و کومارین، به‌عنوان کنترل به‌کار برده شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن داخل هرکدام از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شد و انکوبه گشت. پس از گذشت ۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج گشت و مایع رویی دور ریخته شد و داخل هرکدام ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO اضافه شد تا فورمازان شکل گیرد. برای پلیت‌ها به‌مدت ۸ دقیقه به‌صورت عدد ۸ شیکینگ صورت گرفت و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر سنجیده شد. درصد بقای سلولی در گروه کنترل، منفی ۱۰۰ منظور شد و درصد بقای سلول‌هایی که تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفته بودند، با تقسیم جذب چاهک‌های تیمارشده، به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش دهد، به‌عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد. این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel تعیین گشت.

استخراج RNA با ترایزول:

برای استخراج RNA، سلول‌های تیمارشده با پایلوشات و کومارین و ترکیب این دو، به سلول‌های ترایزول اضافه شدند تا سلول‌ها لیز شوند. سپس سلول‌های لیزشده به میکروتیوب‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند. به میکروتیوب‌ها حدود ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و سپس سروته گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی هر میکروتیوب به میکروتیوب ۵۰ میلی‌لیتری جدید انتقال یافت، سپس به هر میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد افزوده شد و سروته گردید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور RPM 14000 سانتریفوژ گردید. مایع رویی بیرون ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور RPM 900 سانتریفیوژ شد، مایع رویی بیرون ریخته شد، اتانول به‌دقت خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس به هر میکروتیوب ۴۰ میکرولیتر آب حاوی محلول DEPC افزوده شد و برای ادامه مراحل، در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد تیوب‌ها را به‌مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ کرده، مایع رویی بیرون ریخته شد و تیوب‌ها در دمای اتاق کاملاً خشک شد و در پایان به تیوب‌ها ۲۰ ماکرولیتر DEPC ریخته و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس OD و غلظت آن‌ها برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر با دستگاه نانو درآپ سنجیده شد.

سنتز cDNA با کیت استخراج شرکت سیناژن:

۱ میکروگرم از total RNA را که با ۱ ماکرولیتر Oligo-dT و ۱ ماکرولیتر dNTP (10mM) و آب DEPC مخلوط کرده بودیم، با حرارت ۶۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه کردیم. سپس ۲ ماکرولیتر 10X RT buffer، ۲ ماکرولیتر M1 Buffer، ۱ ماکرولیتر RTase، ۱ ماکرولیتر RNase inhibitor و آب تیمارشده با DEPC را اضافه کرده، تیوب‌ها را در دستگاه PCR قرار داده، به دستگاه، برنامه‌ی ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه ۴۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه داده شد تا cDNAها سنتز شوند.

طراحی پرایمر:

برای طراحی پرایمر، ابتدا توالی کلّ ژن و توالی اگزون‌های ژن موردنظر را از سایت NCBI پیدا کرده، این توالی را در نرم‌افزار Pre Primer قرار داده، جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومولار مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که از ژن GAPDH به‌عنوان ژن خانه‌گردان استفاده شد.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورد استفاده در Real Time – PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول PCR (bp)	Tm آغازگر
Bcl2(F)	5′ TTGTAATTCATCTGCCGCCG 3′	164	58.99
Bcl2(R)	5′ CAATGAATCAGGAGTCGCGG 3′		59.7
Bax(F)	5′ AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT 3′	236	59.03
Bax(R)	5′ GTTCTGATCAGTTCCGGCAC 3′		58.92
GAPDH(F)	5′ CTGACTTCAACAGCGACACC 3′	172	59.14
GAPDH(R)	5′ GTGGTCCAGGGGTCTTACTC 3′		59.10

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

انجام Real time PCR:

واکنش Real time PCR به‌صورت تکرارهای ۳ تایی صورت گرفت. بدین‌شکل که در تیوب‌های مخصوص Real time PCR ۱ ماکرولیتر cDNA و ۱۹ ماکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمر فوروارد (۰/۲ ماکرومولار)، ۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز (۰/۲ ماکرو مولار)، ۷ ماکرولیتر DEPC و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 1x Real time ریخته شد. بعد تیوب‌ها در دستگاه Real time PCR قرار داده شد و دستگاه run گردید.

جدول شماره ۲- پروتکل سیکل‌های به‌کار برده‌شده برای انجام Real-Time PCR ژن Bax، Bcl2 و Gapdh

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال‌سازی اوّلیه	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
جداسازی	۹۵	۱۵ ثانیه	۴۵
اتصال و جذب نوری	۵۵،۶	۱۰ ثانیه	
طویل‌سازی	۷۲	۱۰ ثانیه	
طویل‌سازی نهایی	۷۴	۲ دقیقه	۱

تحلیل آماری:

برای آنالیز داده‌ها، ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن Gapdh در ژن‌های bax و bcl2 به‌عنوان رفرنس محاسبه شد. در مورد نتایج به‌دست‌آمده برای میزان بیان ژن‌ها، CTهای به‌دست‌آمده برای هر ژن توسط فرمول۲-ΔΔCT محاسبه گردید. به‌منظور بررسی نتایج داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی و مقایسه بیان ژن‌ها در غلظت‌های مختلف کومارین، عصاره باکتری و ترکیب باکتری و کومارین، از آزمون تحلیل واریانس ANOVA استفاده گردید.

فرمول محاسبه تغییر بیان نسبی:

Concentration = efficiency average CT (controls) – average CT (samples)

Relative expression= Concentration of gene of interest / Concentration of reference gene

$$\Delta Ct = Ct_{(TG)} - Ct_{(RGI)}$$

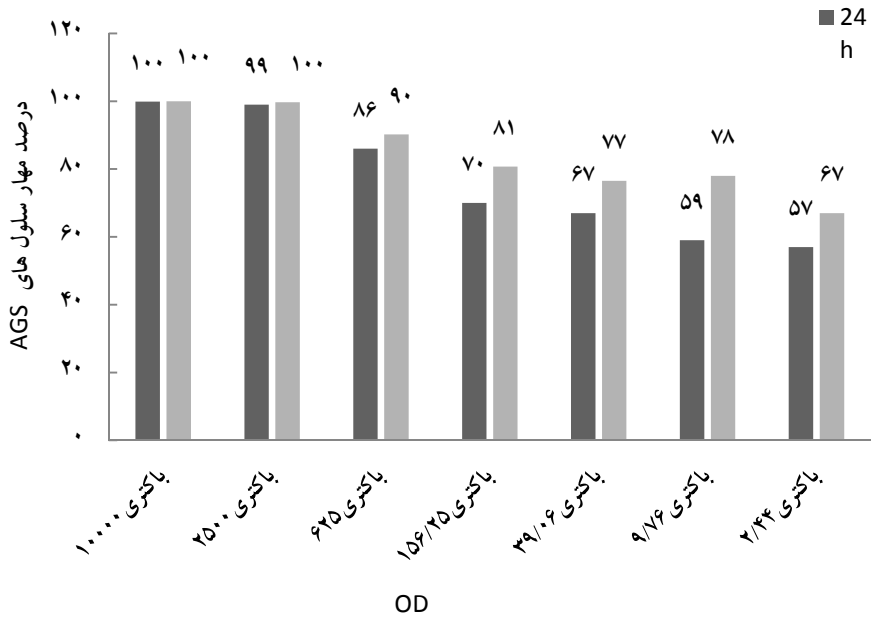
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{(Control)}$$

$$Ration = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

نتایج

تأثیر لاکتوباسیلوس روتری بر روی سلول‌های AGS

ابتدا محدوده IC۵۰ و یا به‌عبارتی غلظتی از دارو که ۵۰ درصد رشد سلول‌ها را در مقایسه با کنترل مهار می‌کند، تعیین شد. نتایج بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف میزان مهار در دوز ۱۰۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر، بیشترین مهار معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) را داشت. رفته‌رفته از مهار کم شد تا جایی‌که در غلظت ۲/۴۴ میکروگرم در میکرولیتر، ۶۰ درصد مهار دیده شد. نتیجه به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بین غلظت لاکتوباسیلوس روتری و مهار سلول‌های سرطان معده اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (نمودار شماره ۱).



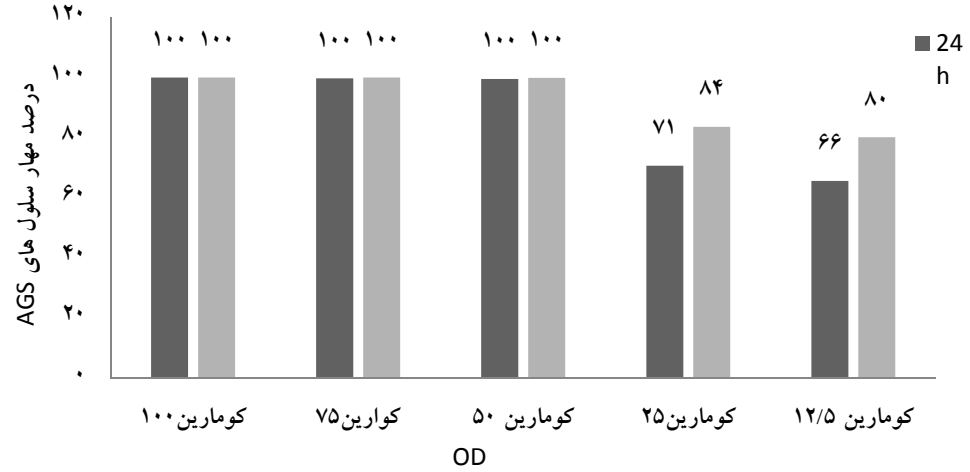
غلظت عصاره باکتری (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

نمودار شماره ۱- تأثیر لاکتوباسیلوس روتری بر روی درصد مهار نسبی سلول‌های AGS در ۲۴ و ۴۸ ساعت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

- تأثیر کومارین بر روی سلول‌های AGS

ابتدا محدوده IC_{50} و یا به‌عبارتی غلظتی از دارو که ۵۰ درصد رشد سلول‌ها را در مقایسه با کنترل مهار می‌کند، تعیین شد. سپس تأثیرات غلظت‌های مختلف کومارین با استفاده از سنجش MTT ارزیابی شد. نتایج بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف میزان مهار در دوز ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ بیشترین مهار معنی‌دار را داشت و رفته‌رفته از مهار کم شد تا جایی‌که در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میکرولیتر در ۲۴ ساعت ۶۰ درصد و ۴۸ ساعت ۸۰ درصد مهار را نشان داد. نتیجه به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بین غلظت کومارین و مهار سلول‌های سرطان معده، اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱$) (نمودار شماره ۲).

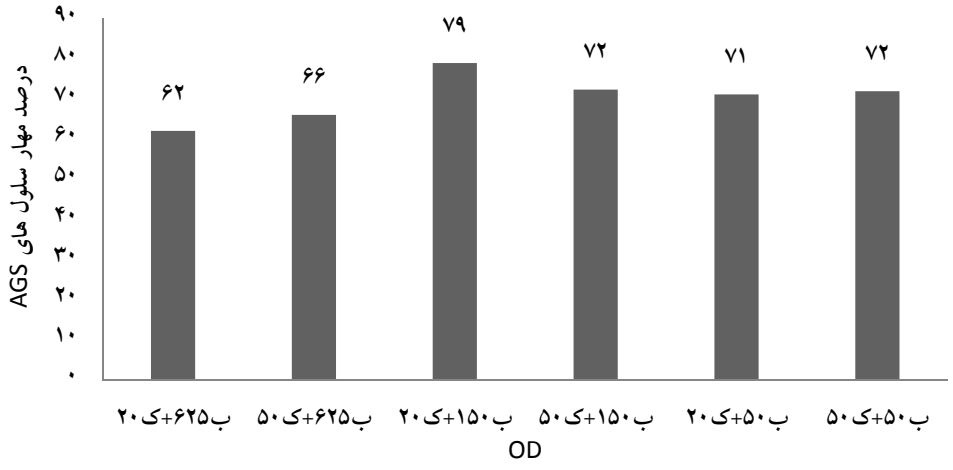


غلظت عصاره کومارین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

نمودار شماره ۲- تأثیر کومارین بر روی درصد مهار نسبی سلول‌های AGS در ۲۴ و ۴۸ ساعت

- تأثیر ترکیب *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین بر روی سلول‌های AGS

ابتدا محدوده IC_{50} و یا به‌عبارتی غلظتی از دارو که ۵۰ درصد رشد سلول‌ها را در مقایسه با کنترل مهار می‌کند، تعیین شد. سپس تأثیرات غلظت‌های مختلف این ترکیب با استفاده از سنجش MTT ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بین ترکیب غلظت‌های مختلف کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* بر روی مهار سلول‌های سرطان معده رابطه معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۱$) (نمودار شماره ۳).



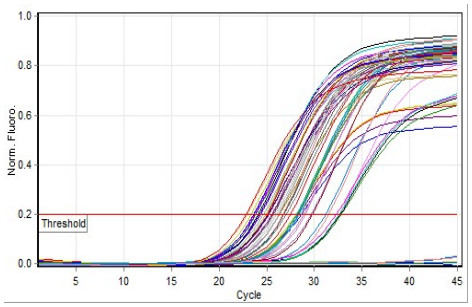
ترکیب غلظت باکتری و عصاره کومارین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

نمودار شماره ۳- تأثیر ترکیب لاکتوباسیلوس روتری و کومارین بر روی درصد مهار سلول‌های AGS در ۲۴ ساعت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

- بررسی تغییر بیان ژن‌های BAX، BCL2 و Gapdh در سلول‌های AGS به‌دنبال تأثیر هم‌زمان و جداگانه‌ی *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین به روش Real Time PCR:

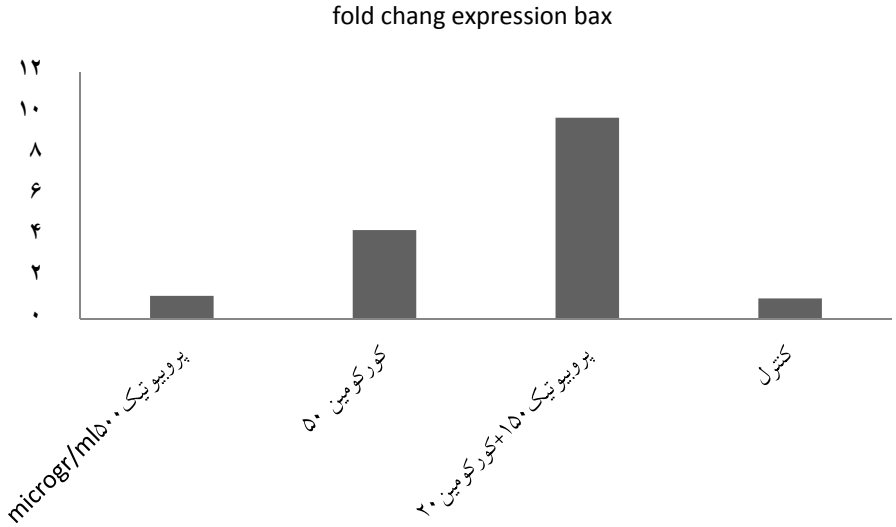
برای این منظور پس از انجام تنظیمات اوّلیه و تأثیرگذاری دوزاژهای مختلف دارویی، استخراج RNA صورت گرفت و پس از سنتز cDNA با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی الگوی بیان بررسی شد. شکل شماره (۱) منحنی تکثیر و ذوب ژن‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۱- منحنی تکثیر ژن‌های bax، bcl2 و Gapdh

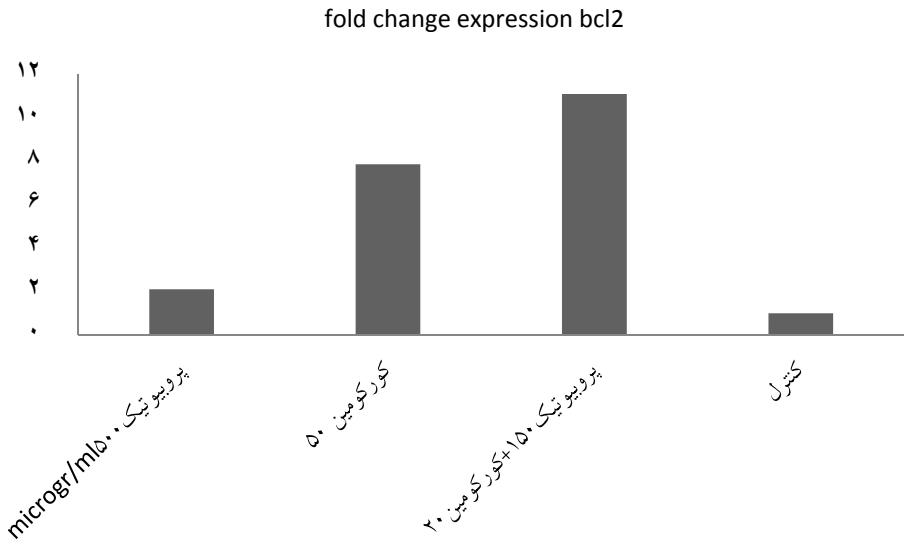
- مطالعه‌ی اثر متابولیسم ثانویه *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین بر روی بیان ژن BAX و BCl2 در سلول‌های رده AGS در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌وسیله Real time RT-PCR:

پس از اِعمال روش اضافه‌شدن دم پلی A و براساس توالی اختصاصی ژن، بیان ژن BAX و BCl2 در رده سلولی AGS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد: زمانی‌که لاکتوباسیلوس اعمال می‌شود، بیان ژن BCl2 نسبت به کنترل، ۲ برابر می‌شود؛ اما BAX تغییر چندانی نمی‌کند و زمانی‌که کومارین را اعمال می‌کنیم، BCl2 نسبت به کنترل ۸ برابر و BAX چهار برابر می‌شود. اما زمانی‌که کومارین و لاکتوباسیلوس را با هم اعمال می‌کنیم، بیان دوچندان برابری نسبت به زمانی‌که کومارین و لاکتوباسیلوس را تنها اعمال می‌کردیم، در مقایسه با کنترل خواهیم داشت (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴- نسبت بیان ژن رده bax در مجاورت لاکتوباسیلوس روتری و کومارین در سلول‌های رده AGS در مقایسه با نمونه‌های کنترل در گروه‌های با غلظت باکتری ۵۰۰ میکروگرم، کومارین ۵۰ میکروگرم، در گروه‌های باکتری ۱۵۰ میکروگرم و کومارین ۵۰ میکروگرم و کنترل، مقادیر P به‌ترتیب برابر با (P=۰/۰۹۱)، (P=۰/۰۴۱) و (P=۰/۰۲۸) می‌باشد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]



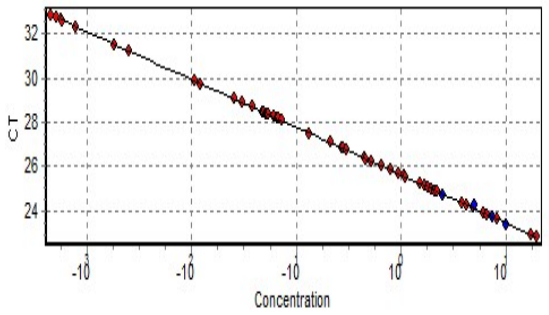
نمودار شماره ۵- نسبت بیان ژن bcl2 در مجاورت لاکتوباسیلوس روتری و کومارین در سلول‌های رده AGS در مقایسه با نمونه‌های کنترل در گروه‌های با غلظت باکتری ۵۰۰ میکروگرم، کومارین ۵۰ میکروگرم، در گروه‌های باکتری ۱۵۰ میکروگرم و کومارین ۵۰ میکروگرم و کنترل، مقادیر P به‌ترتیب برابر با (P=۰/۰۸۶)، (P=۰/۰۰۳۱) و (P=۰/۰۰۱۸) می‌باشد.

- نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های Real time PCR :

به‌منظور بررسی نتایج داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی و مقایسه بیان ژن‌ها در گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس ANOVA استفاده گردید. ارزش P<۰/۰۵ به‌صورت معنی‌دار و ارزش P<۰/۰۱ به‌صورت بسیار معنی‌دار تفسیر می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تفاوت میانگین بیان ژن Bcl2 در سطح P<۰/۰۱ و ژن Bax در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد (جدول شماره ۳).

- منحنی استاندارد Real time PCR:

منحنی استاندارد تعداد چرخه آستانه در برابر ورود به سیستم از غلظت الگوی اوّلیه در نانوگرم رسم گردید (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- نمودار استاندارد

بحث

سرطان معده از دسته سرطان‌هایی است که طی سالیان و به آرامی رشد می‌کند. قبل از این‌که سرطان به معنای واقعی ظاهر شود، تغییراتی در لایه‌های معده ایجاد می‌گردد. در حدود ۸۵ درصد از سرطان‌های معده را آدنوکارسینوم‌ها و ۱۵ درصد آن‌ها را لنفوم‌ها و تومورهای استرومایی معده‌ای - روده‌ای و لیومیوسارکوم تشکیل می‌دهند [۳،۲]. *لاکتوباسیلوس روتری* یک باکتری گرم مثبت است که به‌طور طبیعی در روده‌ی پستانداران و پرندگان حضور دارد [۳۰]. این باکتری باعث تولید ترکیب ضدّمیکروبی همچون ruterin یک ترکیب (β-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) می‌شود که در اثر تخمیر گلیسرول در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود و اثراتی با طیف گسترده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها دارد [۱۷،۱۶]. دوز کشنده‌ی آن برای باکتری‌های پاتوژن ۵ برابر کمتر از دوز موردنیاز برای از بین بردن باکتری‌های فلور طبیعی روده است؛ درنتیجه این ماده می‌تواند بدون آسیب‌رساندن به باکتری‌های مفید روده، جلوی رشد و تکثیر باکتری‌های مهاجم را بگیرد [۳۱]. در حال حاضر فعالیت وسیع ضدّمیکروبی *لاکتوباسیلوس روتری* به‌عنوان مهم‌ترین عامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت‌ها مطرح است [۱۵]. کومارین‌ها یکی از فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان می‌باشند که از قسمت‌های مختلف گیاهان استخراج می‌شوند و طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی را نشان می‌دهند [۳۲]. کومارین‌ها در سلول‌های سرطانی، مسیرهای مختلفی را هدف قرار می‌دهند و طیف وسیعی از مکانیسم‌ها و راهکارها را برای جلوگیری از پیشرفت یا سرکوب سرطان از خود نشان می‌دهند [۳۳]. برخی از کومارین‌ها از طریق گیرنده‌های سطح سلولی، پیام‌هایی را به داخل سلول می‌فرستند که ممکن است منجر به

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

توقف رشد سلول شود. بعضی نیز از طریق افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی و یا کاهش بیان ژن‌های آپوپتوزی باعث فعال‌شدن آپوپتوز می‌شوند [۳۴]. آپوپتوز یک رخداد طبیعی سلولی است که به کمک آن میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن تنظیم و از ایجاد سرطان جلوگیری می‌شود. چون در این فرآیند، سلول، مسؤول مرگ خود است، به آن خودکشی سلولی هم گفته می‌شود [۳۵]. کاهش آپوپتوز می‌تواند نقش مهمّی در بروز سرطان ایفا کند. به‌طور معمول سه مکانیسم وجود دارد که به‌وسیله آن‌ها آپوپتوز کاهش می‌یابد یا مقاومت پیدا می‌کند. اختلال در تعادل پروتئین‌های پروآپوپتوزی و ضدّآپوپتوزی، کاهش عملکرد کاسپازها و اختلال سیگنالینگ گیرنده‌های مرگ را به دنبال دارد. اختلال در تعادل پروتئین‌های پروآپوپتوزی و ضدّآپوپتوزی باعث اختلال در تنظیم آپوپتوز می‌گردد [۳۶]. پروتئین‌های چند دومینی پیش‌آپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 مانند Bax و Bak از طریق برهم‌کنش مستقیم با Bid به‌عنوان یک پروتئین پیش‌آپوپتوزی-BH 3 only فعال می‌شوند و از طرف دیگر اتصال سایر پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی BH-3 only به اعضای ضدّآپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 منجر به فعال‌شدن Bax و Bak می‌گردد. در حالت عادی Bax در سیتوزول واقع شده است، اما در پاسخ به تحریک مرگ، متحمل تغییر کانفورماسیونی گشته، در غشای خارجی میتوکندری قرار می‌گیرد که منجر به نفوذپذیر شدن غشای خارجی میتوکندری و آزاد شدن پروتئین‌های پروآپوپتوتیک می‌شود [۳۷]. پژوهش‌ها نشان دادند که کومارین‌ها از توانایی بالا برای مهار و درمان سرطان برخوردار هستند. بر این اساس طبق مطالعات ملکی و همکارانش که در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، به این نتیجه رسیدند که ماده‌ی ۸-ژرانیل اکسی کومارین می‌تواند بر سلول‌های سرطانی پروستات اثرات ضدّسرطانی داشته باشد [۳۸]. همچنین در مطالعات دیگری که توسط بابایی و همکارانش در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، به این نتیجه رسیدند که بین دو متغیر غلظت فارنسیفرول C و درصد سلول‌های زنده AGS رابطه معکوس و معنی‌داری وجود دارد ($P\leq$۰/۰۰۱) [۳۹]. مطالعه دیگری که توسط Rasul و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت، نشان داد که ترکیب کومارینی xanthoxyletin دارای فعالیت مهار تکثیر سلول توموری به‌خصوص سلول‌های SGC-7901 (سلول‌های سرطان معده) است [۴۰]. مطالعات Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان داد که اسکولتین اثرات ضدّتکثیری در برابر سلول‌های سرطان معده را نشان می‌دهد و آپوپتوز آن‌ها را به‌صورت وابسته به دوز و با سمیت کمتر نسبت به سلول‌های اپیتلیال معده ایجاد می‌کند [۴۱]. مطالعات نعمتی و تقوی در سال ۱۳۹۲ نشان داد که عصاره اتانولی گیاه گلپر، دارای اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد. اطلاعات حاصل از این تحقیق به روشنی اثرات مهاری عصاره اتانولی ریشه گیاه *Heracleum persicum* بر رده سلول‌های سرطانی MCF7 را نشان می‌دهد [۴۲]. همه مطالعات پیشین که در مورد اثر کومارین و ترکیبات آن بر روی سرطان‌های مختلف انجام گرفته با نتایج ما همخوانی دارد و کومارین باعث مهار سلول‌های سرطان معده می‌شود. تأثیر *لاکتوباسیلوس روتری* در سرطان‌ها بسیار بحث‌انگیز است. جوانیان و زارع در طی مطالعه‌ای مشاهده نمودند که سوپرناتانت‌های حاصل از *لاکتوباسیلوس روتری* با تأثیر بر سلول‌های سرطانی باعث کشته شدن سلول‌های سرطانی می‌شوند [۴۳]. در مطالعه دیگری که توسط GHONEUM و FELO انجام گرفت، نشان داده شد که PFT (*Lactobacillus kefiri*)، برای سلول‌های سفید خون ایمن است و به‌طور انتخابی اثرات آپوپتوزی را در سلول‌های سرطانی معده ایجاد می‌کند. بنابراین، ممکن است به‌عنوان یک عامل درمانی برای درمان سرطان معده استفاده شود [۴۴]. مطالعات Hwang و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داد که برای اوّلین‌بار لاکتوباسیلوس کازائی باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده با مهار NF-κB و سیگنالینگ شده است [۴۵]. مطالعات Ijiri و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان داد فراوکریم حاصل از پروبیوتیک، باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده می‌شود [۴۶]. مطالعات پیشین انجام‌گرفته در مورد پروبیوتیک با نتایج ما مطابقت دارد و لاکتوباسیلوس باعث مهار سلول‌های سرطان معده می‌گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ای که در مورد بررسی تأثیر ترکیب متابولیسم ثانویه *لاکتوباسیلوس روتری* و کومارین بر روی مهار سلول‌های سرطانی معده انجام گرفت، نشان داد که لاکتوباسیلوس در غلظت ۱۰۰۰۰ و کومارین در غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر باعث مهار سلول‌های AGS می‌شود و ترکیب این دو باعث می‌شود تا سلول‌های AGS کمتر رشد کنند. بررسی نتایج حاصل از آزمون Real time PCR مشخص کرد که میزان بیان ژن Bax و Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. با توجه به اثرات کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* در مهار تکثیری سلول‌های AGS، افزایش ژن Bax و Bcl2 می‌توان نتیجه گرفت که کومارین و *لاکتوباسیلوس روتری* می‌توانند با تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شوند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. همچنین از تمامی کسانی‌که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد پریسا فومن آجیرلو با کد پایان‌نامه ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۷۱۰۰۷ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می‌باشد.

***References*:**

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. ***CA Cancer J Clin*** 2005; 55(2): 74-108.

[2] Roshanai G, Kazemnejad A, Sadighi S. Survival estimating following recurrence in gastric cancer patients and its relative factors. ***Koomesh*** 2011; 12(3): 223-8. [in Persian]

[3] Sun C, Wang Y, Yao HS, Hu ZQ. Allogeneic blood transfusion and the prognosis of gastric cancer patients: Systematic review and meta-analysis. ***Int J Surg*** 2015; 13: 102-10.

[4] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. ***CA Cancer J Clin*** 2011; 61 (2): 69- 90.

[5] Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. ***Methods Mol Biol*** 2012; 863: 411-35.

[6] Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. ***Gastroenterology*** 1998; 114(6): 1169-79.

[7] Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. ***Postgrad Med J*** 2005; 81(957): 419-24.

[8] Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. ***Int J Cancer*** 2003; 107: 113-8. [in Persian]

[9] Saghier A, Kabanja J, Afreen S, Sagar M. Gastric Cancer: Environmental Risk Factors, Treatment and Prevention. ***J Carcinogene Mutagene*** 2013; S14.

[10] Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. ***Altern Med Rev*** 2003; 8(2): 143-55 .

[11] Bujalance C, Moreno E, Jimenez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. ***Int J Food Microbiol*** 2007; 113(1): 28-34.

[12] Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. ***FEMS Immunol Med Microbiol*** 1999; 26(2): 131-5.

[13] Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. ***J Nutr*** 2000; 130(2S Suppl 396): S-402S.

[14] Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. ***Immunol Cell Biol*** 2000; 78: 80-8.

[15] Rosenfeldt V, Michaelsen Kf, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tevede M, et al. Effect of probiotic Lactobacillus strains on ecute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. ***Pediatr Infect Dis J*** 2002; 21: 417-9.

[16] Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacills reuteri*. ***Microb Ecol Health Dis*** 1989; 2(2): 131-36.

[17] Chung TC, Axelsson L, LindgrenS E, Dobrogosz WJ. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. ***Microb Ecol Health Dis*** 1989; (2): 137-44.

[18] Stoyanov EV, Mezger J. Pechmann reaction promoted by boron trifluoride dihydrate. ***Molecules*** 2005; 10(7): 762-6.

[19] Laurin P, Ferroud D, Klich M, Dupuis-Hamelin C, Mauvais P, Lassaigne P, et al. B. Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. ***Bioorganic Med Chem Lett*** 1999; 9(14): 2079-84.

[20] Wu CR, Huang MY, LinYT, Ju HY, Ching H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. ***Food Chem*** 2007; 104(4): 1464-71.

[21] Du L, Li M, Zheng S, Wang B. Rational design of a fluorescent hydrogen peroxide probe based on the umbelliferone fluorophore. ***Tetrahedron Lett*** 2008; 49(19): 3045-8.

[22] Tavolari S, Bonafè M, Marini M, Ferreri C, Bartolini G, Brighenti E, et al. Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade. ***Carcinogenesis*** 2008; 29(2): 371-380.

[23] Yoshiyuki K, Hiromichi O, Shigeru A. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*** 1985; 834(2): 275-8.

[24] Sharma S, Stutzman J D, Kelloff G J, Steele V E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. ***Cancer Research*** 1994; 54(22): 5848-55.

[25] Thati B, Noble A, Creaven B S, Walsh M, Kavanagh K, Egan D A. Apoptotic cell death: A possible key event in mediating the in vitro anti-proliferative effect of a novel copper (II) complex,[Cu (4-Mecdoa)(phen) 2](phen= phenanthroline, 4-Mecdoa= 4-methylcoumarin-6, 7-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]

dioxactetate), in human malignant cancer cells. ***Eur J Pharmacol*** 2007; 569(1): 16-28.
[26] Fylaktakidou K C, Hadjipavlou-Litina D J, Litinas K E, Nicolaides D N. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. ***Curr* Pharm *Des*** 2004; 10(30): 3813-33.
[27] Iranshahi M, Askari M, SahebkarA, Adjipavlou-Litina D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. ***DARU J Pharm Sci*** 2009; 17(2): 99-103.
[28] Curini M, Cravotto G, Epifano F, Giannone G. Chemistry and Biological Activity of Natural and Synthetic Prenyloxycoumarins. ***Current Medicinal chemistry*** 2006; 13(2): 199-222.
[29] Iranshahi M, Kalategi F, Rezaee R, Shahverdi AR, Ito C, Furukawa H, et al. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from Ferula species. ***Planta Med*** 2008; 74(2): 147-50. [in Persian]
[30] Orla-Jensen S. The lactic acid Bacteria. Det Kongelige Danske Videnskasbernes Selskab. ***Naturvidenskabelige Mathematiske Afdeling*** 1919; 8(2).
[31] Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. ***Biomed Res Int*** 2013; 963248.
[32] Vázquez R, Riveiroa ME, Vermeulenc M, Mondillod C, Coombes PH, Crouch NR, et al. Toddaculin, a natural coumarin from Toddalia asiatica, induces differentiation and apoptosis in U-937 leukemic cells. ***Phytomedicine*** 2012; 19(8-9): 737-46.
[33] Kim HH, Sik Bang S, Seok Choi J, Han H, Kim IH. Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti - leukemic decursin and its derivatives and their structure activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. ***Cancer Lett*** 2005; 223(2): 191-201.
[34] Elinos-Báez CM, León F, Santos E. Effects of coumarin and 7OH- coumarin on bcl-2 and Bax expressionin two human lung cancer cell lines in vitro. ***Cell Biol Int*** 2005; 29(8): 703-8.
[35] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995 Mar 10; 276 (5203): 1445-9.
[36] Rastogi P, Sinha P. Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. ***EXCLI J*** 2009; 8: 155-81.
[37] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. ***Am J Physiol Cell Physiol*** 2007; 292(1): C45-51.
[38] Maleki F, Sadeghian H, Bahrami A, Moghaddam M. Synthesis and Evaluation of the Effects of Cellular and Anticancer Cytotoxicity of 8 Garanil Oxymorin on PC3 Prostate Cancer Cells, ***2nd National Conference on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Organic Agriculture, Hamadan, Permanent Secretariat of the Conference, Mofattah College*** September 2015. [in Persian]
[39] Babaei A, Gojaei M, Hosseinpourfizi M. Antinociceptive effect of farnsifrole C nanosilver on gastric cancer cells. ***J Police Med*** 2015; 4 (2): 141-6. [in Persian]
[40] Rasul A, Khan M, Yu B, Ma T, Yang H. Xanthoxyletin, a coumarin induces S phase arrest and apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. ***Asian Pac J Cancer Prev*** 2011; 12(5): 1219-23.
[41] Wang G, Lu M, Yao Y, Wang J, Li J. Esculetin exerts antitumor effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway. ***Eur J Pharmacol*** 2017; 814: 207-15.
[42] Nemati F, Taghavi M. Effect of Cytotoxicity of *Heracleum Persicum* Root Extract on MCF7 Cancer Cells, ***National Conference on Medicinal Plants, Tehran, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Ayatollah Amoli*** 2013. [in Persian]
[43] Javaniyan SH, Zare P. Antitumor effects of supernatants from *Lactobacillus rotiria* culture on K562 cell line of leukemia myeloid cancer cells. ***The 3rd International Conference on Engineering, Science and Technology, Batumi - Georgia, the leading institute of the Karin Conference*** 2015. [in Persian]
[44] Ghoneum M, Felo N. Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by *Lactobacillus kefiri* (PFT), a novel kefir product. ***Oncol Rep*** 2015; 34: 1659-66.
[45] Hwang JW, Yoo HS, Park J, Choi JS. *Lactobacillus casei* Extract Induces Apoptosis in Gastric Cancer by Inhibiting NF-κB and mTOR-Mediated Signaling. ***Integrative Cancer Therapies*** 2012; 12(2): 165–73.
[46] Ijiri M, Fujiya M, Konishi H, Tanaka H, Ueno N, Kashima S, et al. Ferrichrome identified from *Lactobacillus casei* ATCC334 induces apoptosis through its iron-binding site in gastric cancer cells. ***Tumor Biol*** 2017: 1–12.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-16]