Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۰

مهار رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی

مرضیه باقری[۱]، دکتر مهدی محمدزاده[۲]، دکتر امیر توکمه‌چی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: این تحقیق به منظور بررسی تاثیر فراکشن‌های پروتئین با وزن مولکولی بالا و پایین به دست آمده از دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش‌ها: ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی و در شرایط بی‌هوازی کشت و پس از شستشو با بافر PBS (Phosphate buffered saline) به کمک دستگاه سونیکاتور، شکسته و جهت جدا کردن دیواره‌ی سلولی از سایر ترکیبات سانتریفیوژ شدند. سپس برای رسوب پروتئین‌های دیواره از اسید تری کلرو استیک ۷۲ درصد و داگزالات سدیم ۱۵ درصد استفاده شد. سپس غلظت‌های ۵۰۰ πg/ml، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ از رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط کشت سلولی تهیه و اخواص سلول‌کشی آن‌ها علیه رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در چاهک به روش رنگ‌سنجی MTT (Microculture tetrazolium test) سنجیده شد.

یافته‌ها: فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی هر دو پروبیوتیک، قادرند به طور معنی‌داری (P = ۰/۰۴۶) رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ را مهار سازند.

نتیجه‌گیری: استفاده از فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا در هر دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به فراکشن‌های پروتئین با وزن مولکولی پایین دارای اثرات ضد سرطانی بیشتری می‌باشد. همچنین فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی دارای درصد سلول‌کشی بیشتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، فراکشن پروتئینی، دیواره‌ی سلولی، رده‌ی سرطانی K۵۶۲

ارجاع: باقری مرضیه، محمدزاده مهدی، توکمه‌چی امیر. **مهار رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ؟؟

مقدمه

واژه‌ی پروبیوتیک که ریشه‌ی لاتین دارد، به معنی "برای زندگی" است. سازمان بهداشت جهانی، این اصطلاح را به "ارگانیسم‌های زنده‌ای" اطلاق می‌کند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات سلامت‌زایی مؤثری برای میزبان خود دارند. این

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر امیر توکمه‌چی
Email: atokmachi@gmail.com

Proof Version
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات تحریکی و تقویتی بر سیستم ایمنی می‌باشند (۱). لاکتوباسیلوس‌ها رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می‌باشند که خواص ضد توموری این دسته از با کتری‌ها در مطالعات گوناگون نشان داده شده است (۲). لاکتوباسیلوس‌ها گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی و متعلق به خانواده‌ی Lactobacillaceae می‌باشند (۳).

باکتری‌های اسید لاکتیک، مکمل‌های غذایی هستند که اثرات سودمندی در میزبان دارند و به تعادل فلور میکروبی روده کمک می‌کنند (۴). این باکتری‌ها نقش مهمی در تولید و نگهداری بسیاری از محصولات غذایی تخمیر شده دارند (۶-۵). لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها با تولید اسیدهای لاکتیک و استیک، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید و آمونیاک قادرند رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌های مضر داخل بدن را متوقف نمایند (۷). همچنین این عوامل قادرند پاسخ‌های ایمنی ذاتی شامل ترشح سایتوکین‌ها از لنفوسیت‌ها را تحریک نمایند (۹-۸). لاکتوباسیلوس‌ها دارای فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی، ضد سرطانی، ضد اسهال و ضد حساسیت هستند (۱۰).

لوسمی به معنای خون سفید و عبارت از تکثیر نئوپلاستیک نوع خاصی از این سلول‌های سفید است (گرانولوسیت، مونوسیت، لنفوسیت یا به احتمال کمتر اریتروسیت‌ها و یا مگاکاریوسیت‌ها). اختلال اولیه از سلول‌های بنیادی خون‌ساز منشأ می‌گیرد که ممکن است میلوئید یا لنفوئید باشد. لوسمی میلوئیدی مزمن یک بیماری اکتسابی ناشی از یک نوع ناهنجاری در کروموزوم ۲۲ یاخته‌های مغز استخوان است. لوسمی میلوئیدی مزمن، در مردان بین سنین ۶۰-۴۰ ۶۰ سال شایع‌تر است و افرادی که تحت پرتوهای یونیزه و یا تماس با بنزین و مشتقات آن قرار داشته‌اند، بیشتر در معرض خطر ابتلا به آن هستند (۱۱).

رده‌ی سلول‌های سرطانی K۵۶۲ جزء سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی است که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله‌ی مبتلا به سرطان خون مزمن جدا شد (۱۲). بسیاری از درمان‌های کنونی برای مهار رشد رده سرطانی K۵۶۲ تا حدود قابل توجهی مؤثر می‌باشند، اما دارای اثرات جانبی هستند. شواهد نشان می‌دهند که برخی از پرو تئین‌های با کتریایی و پپتیدهای کوتاه در برابر سلول‌های توموری مختلف در شرایط In Vitro و In Vivo مؤثر می‌باشند (۱۳). عصاره‌های سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از روده‌ی ماهی کپور معمولی در مقایسه با گروه شاهد که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند، دارای فعالیت سلول‌کشی بر رده‌ی سرطان خون لوسمی میلوئیدی مزمن هستند (۱۴).

هدف از این تحقیق، مطالعه‌ی تأثیر فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی به دست آمده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از روده‌ی ماهی کپور بر رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها

تهیه‌ی سلول سرطانی و کشت آن

سلول‌های سرطانی K۵۶۲ (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI (Roswell Park

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

(Gibco, England) (memorial institute و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, England)، U/ml ۱۰۰ پنی سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز CO_2، در دمای $37\ ^oC$، ۹۵ درصد رطوبت و به مدت ۹۲-۴۸ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد (تا حدود ۸۰ درصد سطح فلاسک)، شمارش و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت باکتری‌ها و تهیه‌ی دیواره‌ی سلولی آن‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه که توسط عزیزپور از روده‌ی ماهی کپور معمولی جدا شده بودند، از کلکسیون میکروارگانیسم آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه تهیه شدند (۱۵).

جهت تهیه‌ی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌ها، به طور خلاصه ابتدا هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه در ml ۱۰ محیط کشت آبگوشت MRS (Merck, Germany) (Man, Rogosa and Sharpe) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای $30\ ^oC$ کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با rpm ۳۵۰۰ و در دمای $4\ ^oC$ سانتریفیوژ و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات M ۰/۱ و pH برابر با ۶/۹ شستشو داده شدند.

رسوب به دست آمده به مدت یک شبانه روز در دمای $-80\ ^oC$ نگهداری شد. سپس باکتری‌ها به روش انجماد و ذوب تجزیه شدند. در مرحله‌ی بعد عمل خرد کردن باکتری‌ها در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (Tomy, Japan) انجام گرفت. در انتها نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای $4\ ^oC$ با rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل نیز به عنوان دیواره‌ی سلولی جدا گردید.

تهیه‌ی رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی

ابتدا ml ۱ از اسید تری‌کلرو استیک ۷۲ درصد با غلظت M ۰/۱ به ml ۱ از نمونه افزوده شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس با افزودن ml ۱ از داگزالات سدیم ۱۵ درصد با غلظت M ۰/۱ به ml ۱ از نمونه، به مدت ۲-۱ ساعت در یخچال گذاشته شد تا پروتئین رسوب کند. در انتها نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $4\ ^oC$ با rpm ۹۳۰۰ سانتریفیوژ شدند (۱۶).

محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل نیز به عنوان پروتئین دیواره‌ی سلولی جدا گردید. سپس رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات M ۰/۱ و pH ۶/۹ شستشو داده شد. غلظت پروتئین‌های موجود در هر کدام از دیواره‌های سلولی با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۷).

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS- PAGE)

جهت بررسی وزن پروتئین‌های به دست آمده از دیواره‌های سلولی از الکتروفورز (SDS- PAGE یا Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) عمودی استفاده شد (BioRad, USA). به صورت دو قسمتی، در بالا ژل SDS-PAGE متراکم کننده‌ی ۵ درصد و در پایین ژل جدا کننده‌ی (Running Gel) ۱۵ درصد تهیه شد. نمونه‌های پروتئینی در حضور نشانگر با اندازه‌ی پروتئینی KD (۲۰۰۰۰۰-۶۵۰۰) در طول ژل تحت جریان الکتریسیته با ولتاژ V ۲۵۰ و به مدت ۳ ساعت حرکت داده و پس از پایان الکتروفورز ژل با رنگ

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

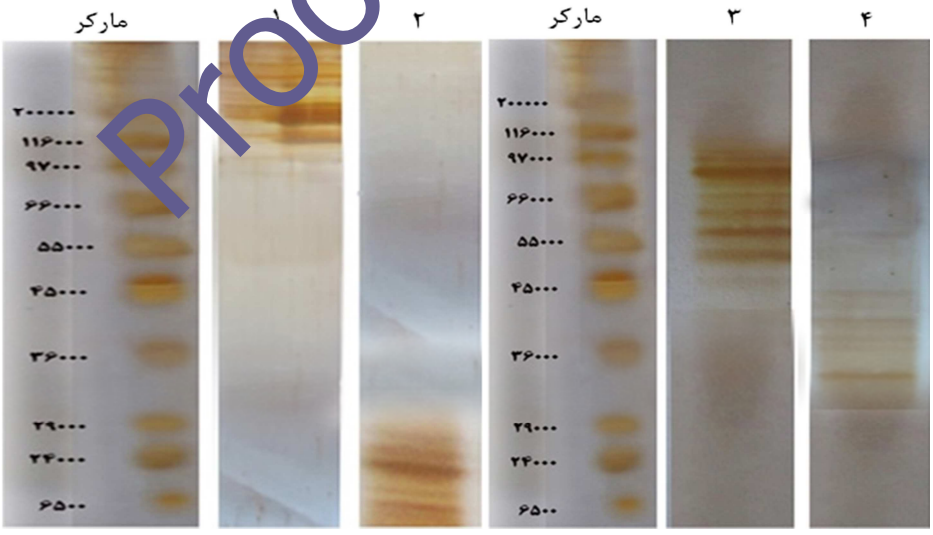
نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و پس از رنگ‌بری با محلول رنگ‌بر (اتانول و اسید استیک) باندهای پروتئین آشکار گردیدند.

جهت جداسازی فراکشن‌های پروتئین از سفادکس G۱۵۰ و ستون کروماتوگرافی cm^2 ۲۰ × ۶۰ استفاده شد (۱۸). پس از آماده شدن ژل و محاسبه‌ی فضای خالی ژل (Void volume)، نمونه‌های پروتئین عبور داده شد. بر اساس جرم مولکولی، ابتدا پروتئین با وزن مولکولی بالا و بعد پروتئین با وزن مولکولی پایین در طی ۱۸ فراکسیون هر کدام به فاصله‌ی ۲ دقیقه و به مقدار ml ۲ جمع‌آوری شدند.

محتوای پروتئین لوله‌ها از تپه‌ی ستون کروماتوگرافی جمع‌آوری و سپس با اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. لوله‌های فاقد پروتئین حذف شدند. سپس یکی از اولین فراکشن‌های حاوی پروتئین با وزن مولکولی بالا و یک فراکشن حاوی پروتئین با وزن مولکولی پایین از هر دو نمونه‌ی لاکتوباسیلوس انتخاب شد و با آزمایش برادفورد، میزان پروتئین فراکشن‌های انتخاب شده سنجیده شد. سپس جهت بررسی و مشاهده‌ی باندهای موجود در هر فراکشن، نمونه‌ها الکتروفورز شدند (شکل ۱).

تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی

در این مطالعه عمل رقیق‌سازی توسط محیط کشت RPMI انجام گرفت و رقت‌های µg/ml ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ در شرایط استریل تهیه شد. سپس تا زمان استفاده در دمای ^oC ۸۰- نگهداری شدند. به طور خلاصه، پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول‌های K۵۶۲ به روش تریپان‌بلو، مقدار µl ۱۰۰ (با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMI به همراه ۱۵ درصد FBS یا Fetal bovine serum) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد.



شکل ۱. الکتروفورز فراکشن‌های پروتئینی تهیه شده از دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه. چاهک ۱ و ۲ به ترتیب فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و پایین لاکتوباسیلوس پاراکازئی و چاهک‌های ۳ و ۴ به ترتیب فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و پایین لاکتوباسیلوس کازئی.

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

سپس ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف پروتئین به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰ µl سلول به همراه ۹۰ µl محیط کشت و ۱۰ µl بافر فسفات افزوده شد.

در مرحله‌ی بعد، پلیت‌ها به طور جداگانه به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C و در حضور ۵ درصد گاز CO_2 گرم‌خانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ۲۰ µl از محلول MTT (۳-(۴,۵-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵,۲- Diphenyltetrazolium Bromide) ۵ mg/ml بافر PBS به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیا کرد و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان در آورد.

در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها، با افزودن ۱۰۰ µl محلول دی‌متیل سولفوکساید خالص به چاهک ها و قرار دادن پلیت‌ها در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۴۹۲ nm با استفاده از دستگاه الایزا خوان ثبت گردید. درصد سلول‌کشی با فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد سلول‌کشی =

[OD شاهد / (OD شاهد – ۱۰۰ OD نمونه)]

بر اساس این فرمول، IC۵۰ (غلظتی که موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰ درصد می‌گردد) پروتئین دیواره‌های سلولی محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شدند (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون Kruskal–Wallis و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها، سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < ۰/۰۵۰$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (Office 2010) انجام گرفت.

یافته‌ها

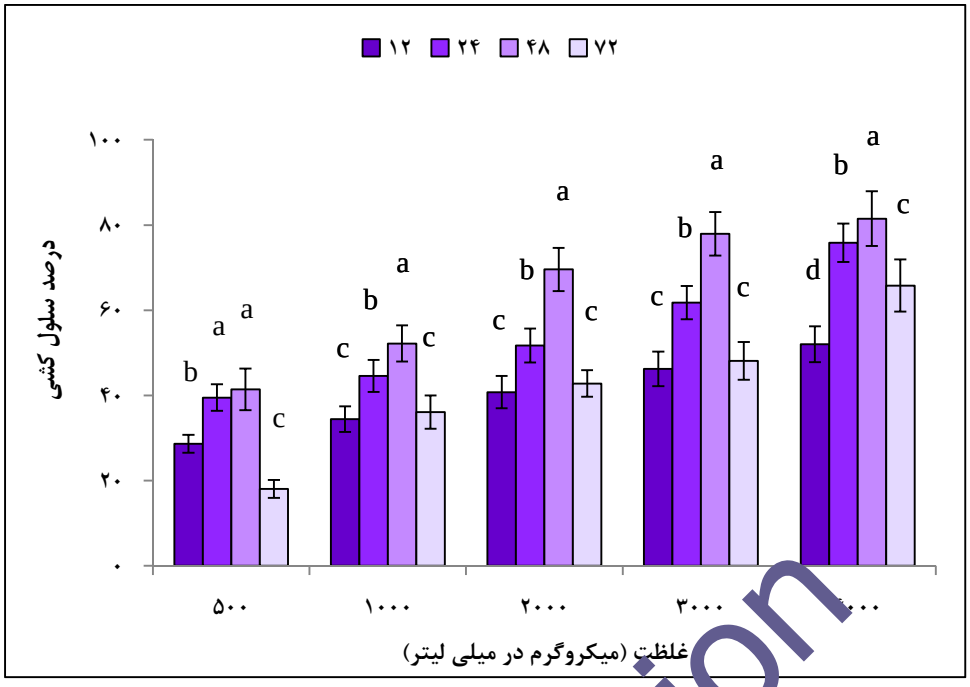
نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌های سلولی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی در مقایسه با گروه شاهد دارای فعالیت سلول‌کشی می‌باشند. بر اساس نتایج به دست آمده، اثر مهاری فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌های سلولی وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، مرگ سلول‌های سرطانی نیز افزایش می‌یابد. همچنین فراکشن‌های با وزن مولکولی بالای دیواره‌های سلولی هر دو گونه‌ی لاکتوباسیلوس، درصد سلول‌کشی بیشتری نسبت به فراکشن‌های با وزن مولکولی پایین دارند.

همچنین علاوه بر افزایش غلظت با گذشت زمان در هر دو فراکشن لاکتوباسیلوس کازئی، درصد سلول‌کشی هم بیشتر شد و بهترین زمان برای سلول‌کشی ۷۲ ساعت بود (شکل‌های ۲ و ۳). اما در مورد لاکتوباسیلوس پاراکازئی، بهترین زمان برای سلول‌کشی، ۴۸-۲۴ ساعت در هر دو فراکشن بود و در زمان ۷۲ ساعت کمتر شد (شکل‌های ۴ و ۵).

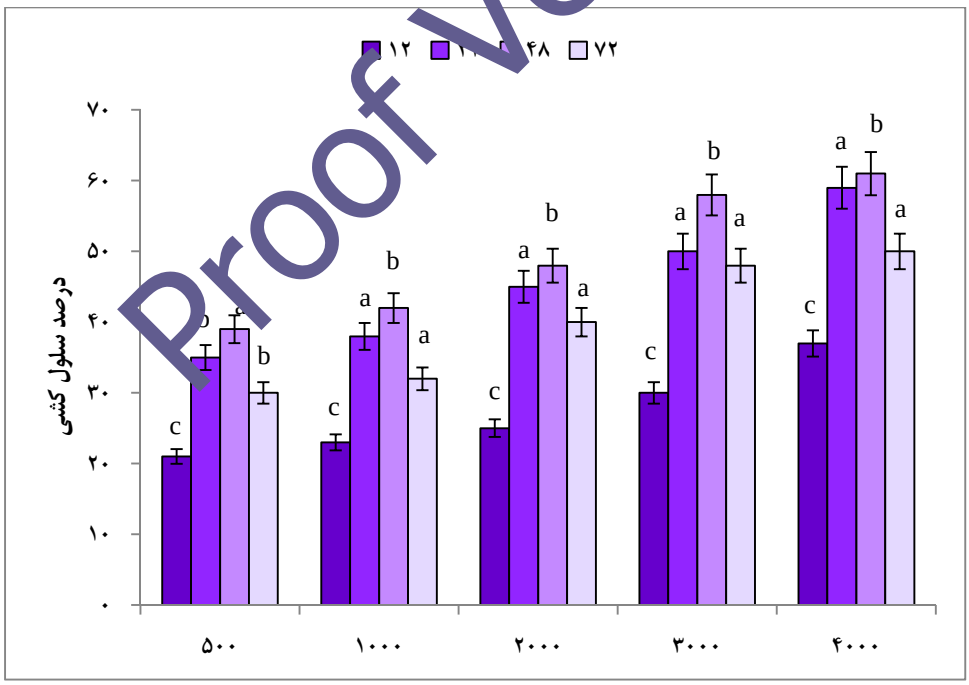
Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID



شکل ۲. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالای دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها، نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵۰ می‌باشد)

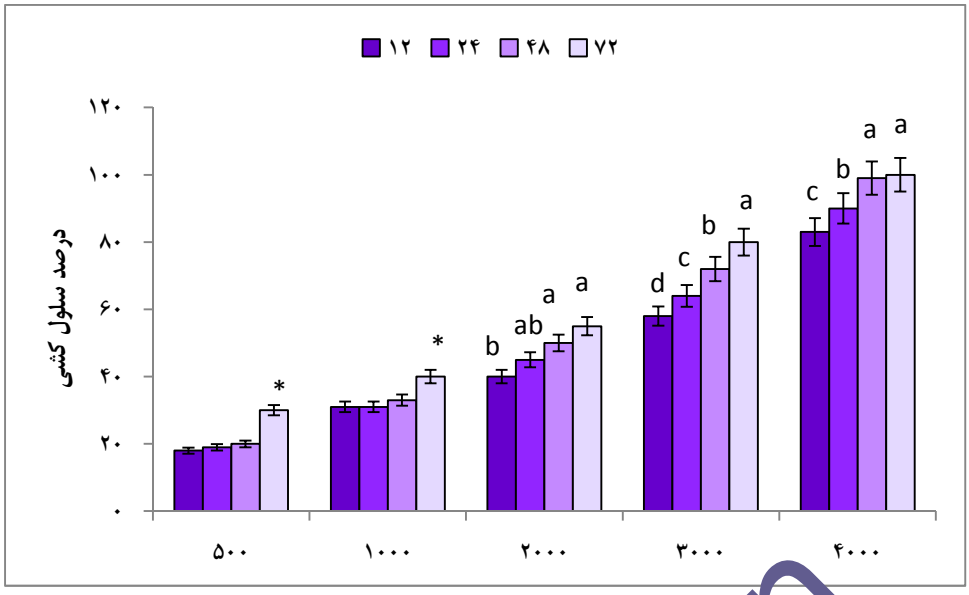


شکل ۳. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵۰ می‌باشد)

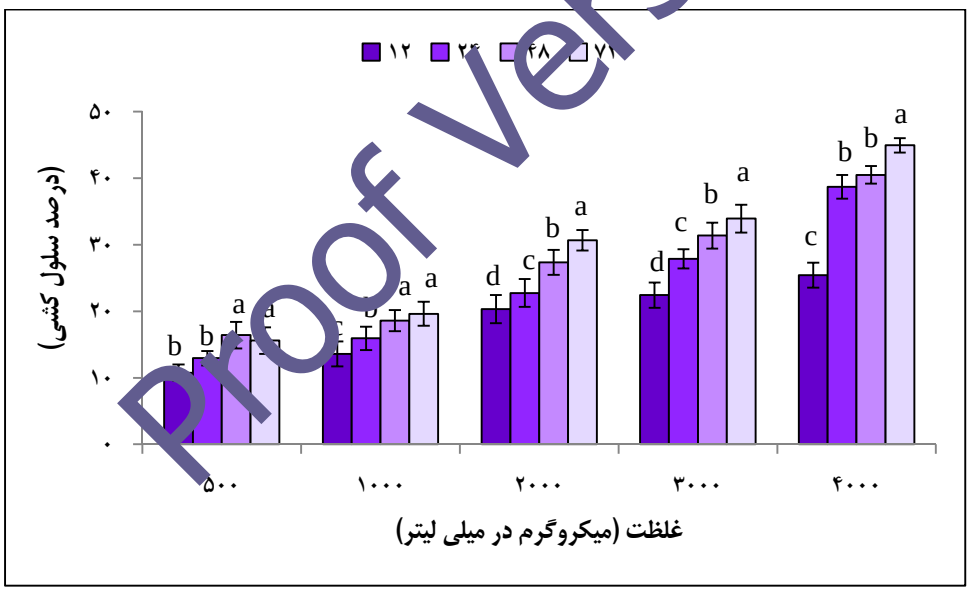
Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالای دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس پاراکازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد).



شکل ۵. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس پاراکازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد).

بحث

تأثیر متابولیت‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک در مهار رشد سلول‌های سرطانی ثابت شده است. پروبیوتیک‌ها می‌توانند با اتصال به مواد سرطان‌زا و پیش سرطان‌زا، آن‌ها را مهار و حذف نمایند. همچنین طبق یافته‌های محققین، شیر تخمیر شده‌ی حاوی

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های L. acidophilus، B. animalis، B. bifidum، B. Infantis و L. Paracasei رشد رده‌ی سلولی MCF۷ را مهار می‌کند (۲۰).

همچنین Fichera و Giese گزارش کردند که پپتیدوگلیکان جدا شده از دیواره‌ی سلولی Lactobacillus casei قادر است رشد سلول‌های سرطانی انسان و موش را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید (۲۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد، تیمار سلول‌های HT۲۹ (یکی از رده‌های سلول‌های سرطانی کولون) با پلی ساکاریدهای جدا شده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیل ۶۰۶، باعث مهار سلول‌ها می‌شود. این پلی ساکاریدها در اکثر سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز سبب مهار رشد می‌شوند (۲۲).

هنوز مکانیزم دقیق عملکرد ضد سرطانی لاکتوباسیلوس‌ها مشخص نیست؛ اما گفته شده است که یکی از پپتیدهای موجود در عصاره‌ی سیتوپلاسمی آن‌ها لاکتوفرین است. این ماده در انتهای N خود دارای توالی خاصی از اسیدهای آمینه است که خاصیت ضد توموری دارند و موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۳).

مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی تأثیر پروتئین های دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به عنوان یک عامل مهاری سرطان بر یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی K۵۶۲ صورت گرفت. طبق تحقیقات انجام گرفته توسط سایر محققین، عصاره‌ی سلولی لاکتوباسیلوسها دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشد و می‌توانند سلول‌های سرطانی را مهار نمایند (۱۴). در این مطالعه یافته های حاصل از تأثیر رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی باکتری‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی کپور بر مهار رشد سلول سرطانی نشان داد که رسوب پروتئینی دیواره های سلولی هر دو باکتری توانست رشد سلول های سرطانی را مهار نمایند؛ به طوری که با افزایش غلظت قدرت سلول‌کشی آن‌ها افزایش یافت. از این رو نتایج این تحقیق مخالف یافته های کبیری و همکاران می‌باشد (۱۴). دلیل این امر می‌تواند ناشی از این مسأله باشد که در مطالعه‌ی حاضر، رسوب باقی‌مانده به عنوان دیواره‌ی سلولی توسط اتوکلاو استریل شد؛ اما در مطالعات صورت گرفته توسط این محققان، دیواره‌ی سلولی به دست آمده از این باکتری‌ها با فیلتر سرسرنگی µ ۰/۰۲۲ استریل گردید (۱۴).

با توجه به این که ترکیبات ضد سرطانی دیواره‌ی سلولی، به صورت کامل از فیلتر عبور نمی‌نماید، این نتایج تأیید کننده‌ی این مطلب می‌باشد که طبق تحقیقات انجام گرفته توسط سایر محققین، دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوسها دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشد و می‌توانند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد. همچنین P۵۳ یک ژن مرکب کننده‌ی تومور است که به نام نگهبان سلول نیز مشهور است و در انسان بر روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد. فعالیت‌های پروتئین P۵۳ شامل توقف چرخه‌ی سلولی در پاسخ به آسیب DNA و آغاز آپوپتوز در صورت عدم ترمیم DNA می‌باشد. ژن سرکوبگر تومور P۵۳ که به واسطه‌ی جهش‌های نقطه‌ای در بخش بزرگی از تومورهای انسانی غیر فعال شده است، از آپوپتوز جلوگیری می‌نماید و باعث پیشرفت تومور می‌شود. بنابراین P۵۳ به عنوان یک هدف بسیار مناسب برای

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های درمانی به منظور پیشگیری از سرطان در نظر گرفته می‌شود. از این رو جلوگیری از بیان P۵۳ جهش یافته به منظور کاهش تکثیر سلولی، مقاومت شیمیایی و کاهش سرطان‌زایی در رده‌های مختلف سلولی نشان داده شده است (۲۴).

همان‌طور که گفته شد، لوسمی میلوئیدی مزمن (CML یا Chronic myelogenous leukemia) بیماری کلونال سلول‌های بنیادی چند توان است که حاصل جابه‌جایی دو طرفه‌ی کروموزومی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد (۲۵).

این جابه‌جایی کروموزومی باعث به وجود آمدن ژن هیبرید Bcr-abl می‌شود که پروتئین $P210^{Bcr-Abl}$ را کد می‌کند و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین، باعث تکثیر بی‌رویه‌ی این سلول‌ها و نقص در فرایند آپوپتوز می‌گردد (۲۶). از جمله راهکارهای درمانی که تاکنون برای درمان CML به کار گرفته شده است، می‌توان به شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان، درمان با اینترفرون آلفا و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد (۲۷).

در سال‌های اخیر، داروی اختصاصی مهار کننده‌ی تیروزین کینازی Bcr-abl به نام ایماتینب مسیلات (Imatinib mesylate) (ST۱۵۷۱ یا Gleevec) و داروهای نسل‌های بعد از آن، جهت درمان پیشنهاد شده است که امروزه به عنوان خط اولیه‌ی درمان CML به کار می‌رود؛ اما وجود مقاومت دارویی مانع اصلی در بهبود این بیماران با روش‌های درمانی پیش‌گفته است (۲۹-۲۸). از این رو، سلول‌های K۵۶۲ به عنوان مدل فاز حاد بیماری CML به دلیل دارا بودن ژن جهش یافته‌ی P۵۳ انتخاب شد. پس از بررسی اثرات آپوپتوزی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رده‌ی سرطانی K۵۶۲، تأثیر این ترکیبات در میزان بیان پروتئین P۵۳ به روش الایزا ساندویچ سنجیده شد. در این تحقیق پس از اثبات القای آپوپتوز توسط رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی، بیان ژن P۵۳ با اندازه‌گیری میزان پروتئین P۵۳ به روش الایزا سنجیده شد تا تأثیر این ترکیبات بر ژن جهش یافته‌ی P۵۳ در رده‌ی سرطانی K۵۶۲ مشخص گردد.

نتایج نشان داد رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسلوس‌های کازیی و پاراکازیی، باعث کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) سطح پروتئین حاصل از ژن جهش یافته‌ی P۵۳ نسبت به گروه شاهد می‌شوند و میزان سلول‌کشی رسوب پروتئینی دیواره با وزن مولکولی بالا بیشتر از رسوب پروتئینی دیواره با وزن مولکولی پایین است. همچنین طبق نتایج بدست آمده از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین‌های استخراج شده از دیواره‌ی سلولی به عنوان یکی از اجزای مهم دیواره‌ی سلولی هستند که نقش مهمی در کاهش فعالیت سلول‌های سرطانی K۵۶۲ خون دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Schrezenmeir J, de VM. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 361S-4S.
2. de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr 2000; 71(2): 405-11.
3. Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. Nature 1989; 338(6214): 389-94.
4. Hashemi M, Kroczak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. Current Medicinal Chemistry 2005; 4(4): 429-37.
5. Schar-Zammaretti P, Dillmann ML, D'Amico N, Affolter M, Ubbink J. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol 2005; 71(12): 8165-73.
6. Juarez Tomas MS, Ocana VS, Wiese B, Nader-Macias ME. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 12): 1117-24.
7. Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, Delboni RR. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Braz J Microbiol 2004; 35(1-2): 37-44.
8. Gill HS, Rutherfurd KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). Br J Nutr 2000; 83(2): 167-76.
9. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 451S-5S.
10. Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. Nutr Res Rev 2004; 17(2): 277-84.
11. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. Lancet 2007; 370(9584): 342-50.
12. Ekert H, Jurk IH, Waters KD, Tiedemann K. Prophylactic co-trimoxazole and lactobacilli preparation in neutropenic patients. Med Pediatr Oncol 1980; 8(1): 47-51.
13. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett Appl Microbiol 2006; 42(5): 452-8.
14. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Tehran Univ Med J 2011; 68(12): 691-8. [In Persian].
15. Azizpour K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) of West Azarbaijn, Iran. Res J Biol Sci 2009; 4(3): 324-6.
16. Sanchez B, Schmitter JM, Urdaci MC. Identification of novel proteins secreted by Lactobacillus rhamnosus GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. Lett Appl Microbiol 2009; 48(5): 618-22.
17. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 1996. p. 1[illegible]5.
18. Fisher L. Experimental and technique in column of gel filtration chromatography. In: Fisher L, Editor. Gel filtration choromatography. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Publication; 1980. p. 8[illegible]-137.
19. Tsai YT, Cheng PC, Fan CK, Pan TM. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101. Int J Food Microbiol 2008; 128(2): 219-25.
20. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di FG. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. Nutr Cancer 1997; 28(1): 93-9.
21. Fichera GA, Giese G. Non-immunologically-mediated cytotoxicity of Lactobacillus casei and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. Cancer Lett 1994; 85(1): 93-103.
22. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. Cell Microbiol 2008; 10(7): 1442-52.
23. Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y, Tamai Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. J Dairy Sci 2002; 85(9): 2065-74.
24. Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. Oncogene 2006; 25(2): 304-9.
25. Singhal N, Bapsy PP, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. J Assoc Physicians India 2004; 52: 410-6.

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID

26. Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L, Scirneciu C, Andreescu O, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. Bulletin of the Transilvania University of Brasov 2009; 2(51): 97-104.
27. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2006; 81(7): 973-88.
28. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. Biologics 2007; 1(4): 433-48.
29. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009; 453-60.

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.04.2014
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 01.08.2014

In Vitro Growth Inhibition of K562 Cell Line with Cell Wall Protein Fraction of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Paracasei

Marzieh Bagheri[1], Mehdi Mohammadzadeh PhD[1], Amir Tukmechi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: The goal of this study was to evaluate the effect of high and low molecular weight of protein fraction obtained from Lactobacillus casei and L. paracasei cell wall on K562 cell line.

Methods: Bacteria cultured in special medium and incubated in anaerobic condition and washed with PBS and then sonicated and centrifuged for cell wall separation. Protein precipitation was conducted with trichloroacetc acid (72%) and sodium deoxalate (15%). Then different concentrations (500, 1000, 2000, 3000 and 4000 µg/ml) of cell wall proteins were prepared in cell culture medium for each bacteria separately. In vitro anti cancer properties of both bacteria protein were assayed in 12, 24, 48 and 72 hour with a colorimetric method (MTT) with 10000 cells per well.

Findings: Results showed that high and low molecular weight proteins of both bacteria could significant (p=0.046) inhibit the growth of K562.

Conclusion: Based on the results we conclude that high molecular weight of both probiotic bacteria significantly could inhibit the growth of K562 than the low molecular protein fractions. Also, protein fraction of L. paracasei significantly had anti cancer properties than protein fraction of L. casei.

Keywords: Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei, Protein fraction, Cell wall, K562

Citation: Bagheri M, Mohammad Zadeh M, Tukmechi A. **In Vitro Growth Inhibition of K562 Cell Line with Cell Wall Protein Fraction of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Paracasei.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 22

Proof Version

1- MSc Student, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant of Professor, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant of Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Amir Tukmechi PhD, Email: atokmachi@gmail.com

www.SID.ir