

## Research Paper

# Effect of the Cellular Extract of Co-cultured Lactobacillus Casei on BAX and Human $\beta$ -Defensin 2 Genes Expression in HT29 Cells



Mina Yavari<sup>1</sup> , \*Changiz Ahmadzadeh<sup>1</sup>

1. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.



**Citation** Yavari M, Ahmadzadeh Ch. [Effect of the Cellular Extract of Co-Cultured Lactobacillus casei on BAX and Human  $\beta$ -Defensin 2 Genes Expression in HT29 Cells (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(4):364-381. <https://doi.org/10.32598/hms.26.4.3277.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/hms.26.4.3277.1>



**Received:** 24 Oct 2019

**Accepted:** 25 Apr 2020

**Available Online:** 01 Oct 2020

### Key words:

Lactobacillus casei,  $\beta$ -Defensin 2, HT29 cells

## ABSTRACT

**Aims** Defensins are cysteine-rich antimicrobial cationic peptides and BAX is a proapoptotic gene that can cause cell death. This study aimed to investigate the effect of cellular extract of co-cultured Lactobacillus casei on the expression of BAX and human  $\beta$ -defensin 2 (hBD-2) genes in HT29 cells.

**Methods & Materials** This experimental study was conducted in the Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology of Tabriz University of Medical Sciences in 2017. The HT29 cell line was obtained from the Pasteur Institute of Iran, and cells were assessed using Microculture Tetrazolium Test (MTT) after culturing. DNA was extracted from the treated cells, and then the DNA ladder assay was carried out. After preparing cDNA, the expression levels of BAX and hBD-2 genes in the HT29 cell line were measured using a real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

**Findings** The results of the MTT assay indicated that Lactobacillus casei inhibited the proliferation of HT29 cells and induced apoptosis in these cells. Results of DAPI staining and DNA ladder assay obtained from treating HT29 cells by Lactobacillus casei showed qualitative changes in cell apoptosis. Moreover, real-time PCR results indicated that Lactobacillus casei bacteria significantly increased the expression of the hBD-2 gene in HT29 colon cancer cells within 12-24 hours ( $P=0.023$ ), while BAX gene expression showed no significant change in the first 24 hours ( $P=0.37$ ).

**Conclusion** The extract of Lactobacillus casei can be used to stimulate cancer cells to produce  $\beta$ -defensins, inhibit pathogens, prevent the stimulation of cellular signaling, and fight antibiotic-resistant bacteria.

## English Version

### 1. Introduction

Probiotics are dietary supplements consisting of living microorganisms that, after digestion, improve the health of the host and have many benefits [1, 2]. They have great therapeutic efficacy for humans, for instance, they are involved in the treatment of diarrhea caused by irritable bowel

syndrome and colorectal cancer [3, 4]. The role of probiotics in modulating the immune response may be due to the effect of these beneficial microorganisms on the secretion of some cytokines and the expression of genes involved in innate immunity [5, 6]. The type of probiotic effect depends on the production of their biochemically active metabolites, molecules present on the surface of these microorganisms, or their secreted components [7, 8]. In general, probiotics produce a variety of substances, including short-chain fatty acids such as acetate, lactate, succinate, butyrate,  $H_2O_2$ , and

#### \* Corresponding Author:

Changiz Ahmadzadeh, PhD.

Address: Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Tel: +98 (910) 4030464

E-mail: ch\_ahmadzadeh@iau\_ahar.ac.ir

bacteriocin compounds that act on both Gram-positive and Gram-negative bacteria [9, 10]. Defensins are cysteine-rich antimicrobial cationic peptides that are part of innate and acquired immune systems because they can invoke monocytes and neutrophils, and are effective in inducing the production of various cytokines [11]. Defensins are produced by different groups of cells, including neutrophils and intestinal secretory cells, and show high antimicrobial activity in vitro against Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, and viruses [12]. Among these compounds, human  $\beta$ -defensin 2 (hBD-2) has been widely studied because of its effects in strengthening the innate and acquired immune systems and on neutrophils which are the first line of defense in the immune system [12]. Probiotics, by modulating the intestinal microbial flora, exert beneficial effects on the health of the host, and are generally from human sources and considered non-pathogenic. The mechanism of action of probiotics is not fully understood, but some have been proposed to justify their preventive and therapeutic effects in human diseases [13]. Studies have shown that probiotics play an effective role in fighting against cancer by affecting the digestive enzymes of animals and humans, inhibiting carcinogens in the body and in vitro conditions, and suppressing mutations, cancer inducers, and tumors in laboratory animals [14, 15].

Cancer is a genetically heterogeneous disease and the second leading cause of death in the world after cardiovascular diseases. One of the most common types of gastrointestinal cancer in Iran is colorectal cancer which is the third most common cancer in men and the fourth in women [16]. In vitro experiments have shown that probiotics suppress primary neoplastic ulcers and colorectal cancer tumors in rat models [17]. One of the functional mechanisms of probiotics, including Lactobacilli, is the anti-proliferative property of cancer cells by the induction of apoptosis [18]. Therefore, probiotic therapy can treat cancer by two mechanisms: directly inhibiting the growth of pathogenic bacteria by the probiotics, and indirectly inhibiting the secretion of  $\beta$ -defensin and antimicrobial peptides by human cells [19]. BAX is a proapoptotic gene that causes cell death and BAX protein induces programmed cell death [20].

Under normal conditions, BAX is cytosolic in the body, mainly through retransferring from mitochondria to the cytosol by BCL2L1/Bcl-xL, and prevents the accumulation of toxic BAX levels in the mitochondrial outer membrane. Under stress, a conformation change occurs which transfers it to the mitochondrial membrane, leading to the release of cytochrome c, which in turn causes apoptosis [21]. Ogushi et al. showed that several pathogenic bacteria of probiotics, including Lactobacilli, would cause innate immunity by inducing defensin. Pathogenic strains of Salmonella spp. and

Helicobacter pylori were also reported to stimulate hBD-2 expression [22]. Bacterial components of probiotic Lactobacilli induce the expression of defensins and thus affect the antibacterial activity of the intestine. Therefore, the induction of defensins by probiotics, including Lactobacilli may be a new therapeutic strategy to strengthen innate defense mechanisms [23]. This study aimed to investigate the effect of Lactobacillus casei on the expression of hBD-2 and BAX genes in HT29 cancer cells and to determine the possibility of hBD-2 secretion from HT29 cells.

## 2. Materials and Methods

The present study was conducted at the Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology of Tabriz University of Medical Sciences in Iran in 2017. Cell line HT29 was obtained from the Pasteur Institute of Iran and bacteria were obtained from the Persian Type Culture Collection Center. To accurately identify the used Lactobacillus species, they were first identified using the molecular method. The MRS broth medium containing the bacteria was transferred to the tubes and centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes. Then, 800  $\mu$ L of lysis buffer was added to the tubes. The tubes were then placed in a water bath at 85°C for 30 minutes. Next, the tubes were placed in a freezer at -70°C for 10 minutes and then placed back in the water bath, after adding 700  $\mu$ L of chloroform-isoamyl alcohol solution to each tube. The tubes were then centrifuged and the supernatant of the tubes containing the DNA was transferred to new tubes. Cold isopropanol, twice the sample amount, was added to the new tubes, which were placed in a -70°C freezer overnight. The samples were then centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes and the supernatant was poured out. Then, 50 mL of DNase-free distilled water was added to each tube. After the DNAs were extracted, the primers were first evaluated and ordered for synthesis.

To investigate the lethal effect of Lactobacillus casei cell extract on cell line HT29, a colorimetric assay (MTT kit, Sigma Aldrich, Germany) was used. Around 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, and 1 mL/ $\mu$ g of killed bacterial cell extract were treated on HT29 cell line at 24-hour intervals. After that, the contents of 96-well plates were carefully removed and methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) dye was added and kept for 4 hours in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Then, MTT dye was isolated and formazan crystals were produced and dissolved in isopropanol by living cells.

### DAPI staining

To directly investigate the effects of killed Lactobacillus casei extract and living bacteria on HT29 cells, after cell culture and cell proliferation in a 6-well plate, different

**Table 1.** Properties of primers used in the study

Gene	Primer	Primer Sequence	Amplicon Size (bp)
β-defensin	Forward	F:5- GAT GCG TCC ACC AAG AAG- 3	122
	Reverse	R:5- AGT TGA AGT TGC CGT CAG-3	
GAPDH	Forward	F: 5 -CGGTGGATCCCCTTTATTG-3	106
	Reverse	R: 5-CTAACCAGGAATTCGATG-3	
BAX	Forward	F: TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3	101
	Reverse	R-AGCTTCTTGGTGGACGCATC -3	

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Table 2.** Thermal cycler program

Process	Temperature (°C)	Time	No. of Cycles
Initial activation	94	10 min	1
Denaturation	94	15 s	40
Annealing	59	30 s	
Extension	72	25 s	
Final extension	72	5 min	1

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

concentrations of killed bacteria, as well as live bacteria, were poured 20 times the cell size into each 6-well plate along with mesh wells. The bacteria were then treated for 24 hours, fixed by adding 60 mL of 4% paraformaldehyde to each well, and then the cell supernatant was poured out. The cells inside each well were washed with PBS 3 times, and the cells inside each well were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 minutes.

### RNA extraction

All treated and untreated RNAs were extracted using an RNA extraction kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) according to the manufacturer's instructions and its concentration was measured by a spectrophotometer (NanoDrop ND 1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

### cDNA synthesis

The complementary DNA molecules were fabricated with a kit (Fermentas, Germany). The used primers were designed by oligo 5 software and entered into Primer-BLAST online tool at the NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) whose information is presented in Table 1. The primers were synthesized by Takapouzi Company.

### Real-time polymerase chain reaction

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) in the iQ5 detection system (Bio-Rad, USA) was performed in triplicate using a thermal cycler, the information of which is available in Table 2. In real-time PCR tubes, 1 μL of cDNA and 19 μL of SYBR green master mix containing 1 μL of forward primer (0.2 micromolar), 1 μL of reverse primer (0.2 micromolar), 7 μL of DEPC, and 10 μL of master mix 1x real-time were poured. Then, the tubes were inserted in the real-time PCR device.

### Gene expression data analysis

The Cycle Threshold (CT) was determined for each sample. The expression level of each sample was calculated for the relevant genes and GAPDH gene using CT values. The expression ratio of the treated samples to that of control samples normalized by the expression of the GAPDH gene was calculated using the formula provided by Pfaffl (Formula 1):

$$1. \quad \text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

### 3. Results

As shown in [Figure 1](#), the sharp band of *Lactobacillus casei* DNA is observed in agarose electrophoresis. The quantity and quality of DNA were evaluated using the NanoDrop device. All extracted DNA samples had high quality and quantity, with the highest absorption peak at 260 nm. The highest absorption wavelengths of RNA and protein were 230 and 280 nm, respectively. Cancer cells were treated in two ways. In the first method, the cells were treated for 4 hours by co-culturing in plates containing 0.1- $\mu$ m pore-size transfer wells and then the transfer wells containing bacteria were removed. The second method was to kill the bacteria by heating and cooling them continually and treating the cells. In both methods, 12 and 24 hours were considered. After treating the cells with *Lactobacillus casei*, the cells were observed to move towards apoptosis. The probability of hBD-2 gene expression in cells was zero, although the cells were dying. Co-cultured colon cancer cells with nuclear staining indicate apoptosis of these cells. However, an increase in the expression was observed in the molecular study.

After cell treatment, DAPI staining was performed to evaluate cell apoptosis. [Figure 2](#) shows stained and unstained cells imaged by light and fluorescence microscopy.

#### Qualitative evaluation of the extracted RNA

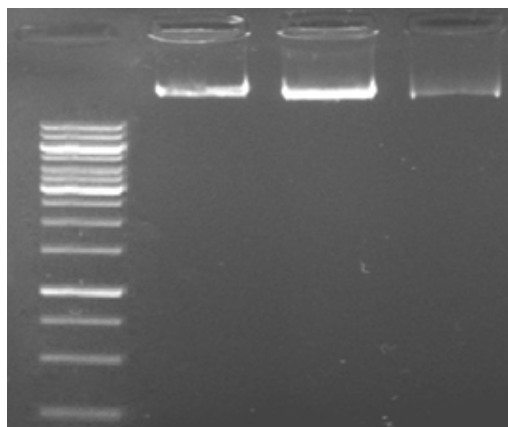
To evaluate the changes in gene expression, after HT29 treatment with *Lactobacillus casei* and its cell extract, RNA was extracted from the treated HT29 cells. Then, the RNA concentration of the samples was measured in the NanoDrop device. To evaluate the quality of the extracted RNAs, the samples underwent electrophoresis on agarose gel ([Figure 3](#)).

#### Real-time PCR results

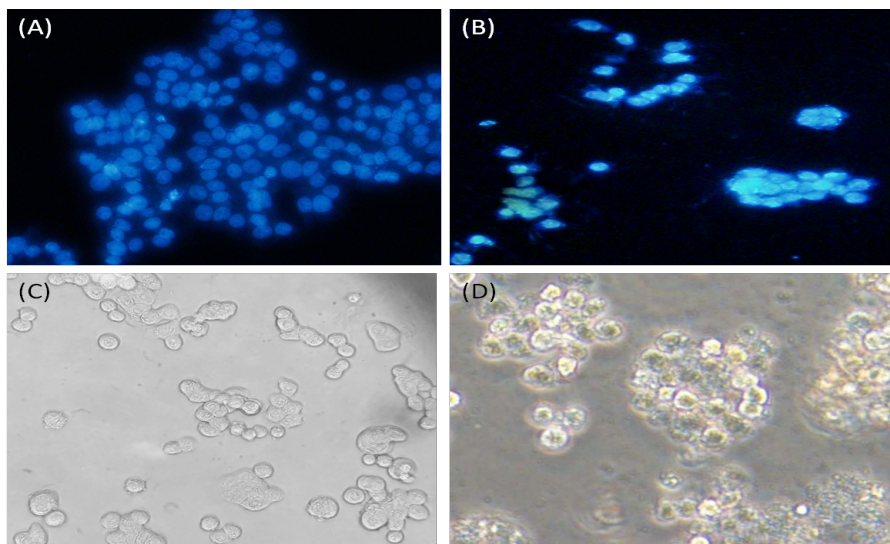
To perform real-time PCR, cells in 6-well plates with 50% inhibitory concentration (IC50) of culture medium were treated with *Lactobacillus casei* bacteria and its cell extract ([Figure 4](#)). The expression levels of BAX and hBD-2 genes in the co-culturing of HT29 colon cancer cells with *Lactobacillus casei* are shown in [Figures 5 and 6](#), which were treated for 12 and 24 hours, and the gene expression changes were measured by real-time PCR. The hBD-2 gene expression showed a significant increase in 24 hours compared to the control group ( $P = 0.023$ ), while BAX gene expression did not show significant changes in 12 hours compared to the control group ( $P = 0.37$ ).

### 4. Discussion

The results of this study showed that, by increasing the expression of the hBD-2 gene under the influence of live and killed extracts of *Lactobacillus casei*, the bacteria showed the ability to stimulate the production of hBD-2 from colon cells, and the live bacteria induced apoptosis in cancer cells; however, the expression of BAX gene did not show a significant change in the first 12 hours. The mechanism of action of probiotics is not fully understood, but some have been proposed to justify their preventive and therapeutic effects in human diseases, including the production of bacterial inhibitory compounds, strengthening the immune system, and stimulating the production of antimicrobial peptides from human cells [13]. Therefore, probiotic therapy can treat cancer by two mechanisms; first by directly inhibiting the growth of pathogenic bacteria by the probiotics, and second by indirectly inhibiting the secretion of hBD-2 and antimicrobial peptides by human cells. Antimicrobial peptides contain 10 to 150 amino acids whose antimicrobial function depends on various factors such as pH, peptide



**Figure 1.** The DNA extracted from sample bacterial after electrophoresis on a 2% agarose gel

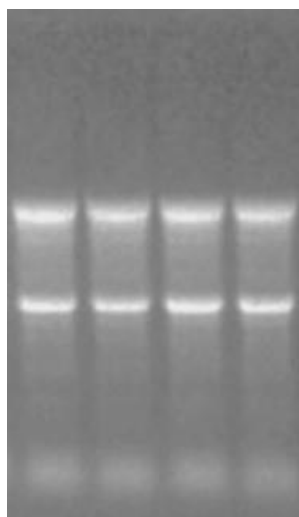


Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 2.** Microscopic image of HT29 cells indicating that HT29 cells chose the apoptotic pathway in the presence of live bacteria; A: DAPI staining and fluorescence microscopic image of healthy and controlled cell nuclei; B: DAPI staining and fluorescence microscopic image of treated and apoptotic cell nuclei; C: Microscopic image of control cells; D: Microscopic image of apoptotic cells

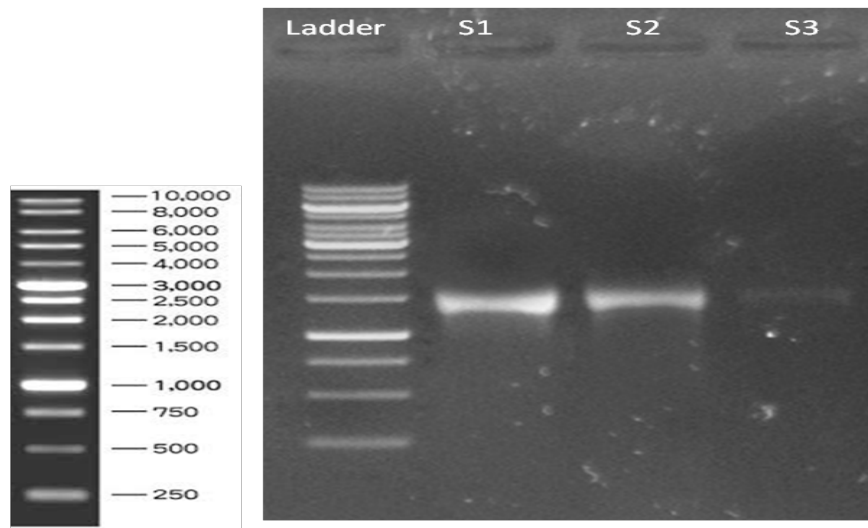
abundance, and salt concentration [19]. They are normally produced from different parts of the body such as skin, intestinal mucosa, oral mucosa, respiratory tract, eyes, and mesenchymal stem cells in bone marrow, but the expression of these proteins is inductively increased in infectious conditions such as wounds or inflammation. These peptides mainly target microbial membranes; hence, because of their applicability, they are new generation antibiotics [24]. A group of these peptides is defensins, which are divided into three groups:  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\theta$ . Beta defensins are one of the largest members of this family, and their copies are found in many vertebrates, invertebrates, and plants. Most

defensins have six cysteine residues, which are not essential for antimicrobial activity but are highly resistant to bacterial proteolysis. Defensins are abundant in cells and tissues that are involved in host defense against microbial infections [25]. The BAX gene is a unique point for the intrinsic apoptosis signaling pathway. This pathway is initiated by various stimuli such as cytokine deprivation and cytotoxic stress and eventually induces programmed cell death [26]. Soltan Dallal et al. [27] examined the effect of two probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on the TLR2 and TLR4 genes expression in HT29 cells infected with *Salmonella Enteritidis*. Their results showed



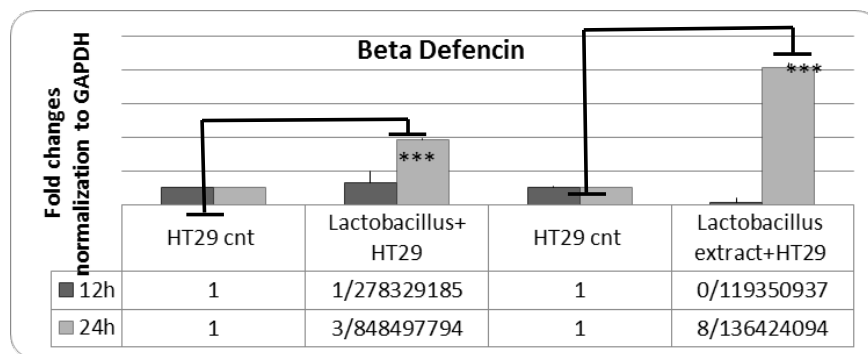
Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 3.** Images of 28S, 5S, and 18S subunits from electrophoresis of extracted RNAs to control their quality



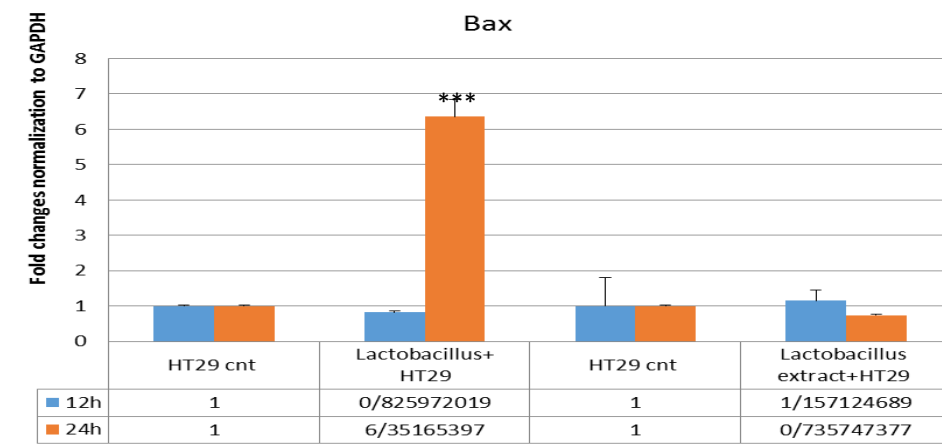
Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 4.** Two percent agarose gel electrophoresis of the PCR product of 16s RNA gene indicating that the band of the second well (S1) is specific and sharp and is suitable for sequencing



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 5.** The expression level of the hBD-2 gene in HT29 cells treated individually by Lactobacillus bacteria for 12 and 24 hours (average of 3 repeats)



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 6.** The expression level of BAX gene in HT29 cells treated individually by Lactobacillus bacteria for 12 and 24 hours (average of 3 repeats)

that after the treatment of healthy and non-infected HT29 cells with each of the two probiotic bacteria, the expression of TLR2 and TLR4 genes increased significantly. In contrast, the expression of these two genes in infected cells before and after treatment with each of the probiotic bacteria was significantly reduced. Karimi Ardestani et al. [28]. In molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and the study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line, showed that *Lactobacillus brevis* reduced survival and proliferation of HT-29 colon cancer cells in a time- and dose-dependent pattern. The highest cytotoxic effect was related to dilution of 1000 µg/mL at 72 hours. The bioavailability depending on dose and time in HT-29 and HEK-293 cells was estimated to be 23% and 50%, respectively. DNA fragmentation test also confirmed the induction of apoptosis by heat-killed bacteria.

Sattari and Ahmadizadeh [29] studied the expression of PTEN and AKT1 genes in the co-culturing of the HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*. Their results showed that *Streptococcus thermophilus* decreased the expression of the AKT1 gene and increased the expression of PTEN and led the cancer cells to apoptosis. MTT test showed that the concentration of OD (0.05) had the highest lethality in 4 hours [29]. According to Taverniti and Guglielmetti [30], bacterial strains of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* probiotics reduce the viability of HT29 and CACO-2 cancer cells. Their results showed that the cellular components of heat-killed bacteria, such as the peptidoglycan cell wall underlying cytoplasmic membrane had cytotoxic effects on cancer cells, which is consistent with our study. Yan et al. [31] showed that solution compounds secreted by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* induce apoptosis in monocytic leukemia cells. As a result, probiotics can be considered as a safe agent for the fight against cancer with no side effects which is consistent with our study. Baldwin et al. [32] showed that *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* can increase apoptosis induction in the LS315 carcinoma cell line and can be used as adjuvants with chemotherapy. This finding is in agreement with our results.

Ali Asgari et al. [33] reported the effects of *Lactobacillus casei* cell extract on increasing the expression of the BAX gene and decreasing the expression of the BCL2 gene in the colon cancer cell and induction of programmed cell death. This finding is also consistent with our Findings. Abdalan et al. showed that aqueous extract of *Quercus infectoria* leaf has an anticancer effect on colon cancer cell line HT29, and can induce apoptosis by increasing the expression of BAX gene in HT29 cells which is consistent with our results [34].

## 5. Conclusion

Despite the stimulation of hBD-2 production by killed extract of *Lactobacillus* bacteria, the extract of these bacteria can be used to stimulate cancer cells to produce hBD-2, inhibit pathogens, prevent the stimulation of cellular proliferation signaling, and fight antibiotic-resistant bacteria.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of the Islamic Azad University of Ahar Branch (Code: 5984).

### Funding

This study was extracted from the Master thesis of the first author approved by the Islamic Azad University of Ahar Branch.

### Authors' contributions

Both authors were equally contributed in preparing this article.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

## مقایسه تأثیر کشت همجوار لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره سلولی آن بر میزان بیان ژن بتادفنسین ۲ انسانی در سلول‌های HT29

مینا یآوری<sup>۱</sup>، \*چنگیز احمدی‌زاده<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.  
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۰۲ آبان ۱۳۹۸  
تاریخ پذیرش: ۰۶ اردیبهشت ۱۳۹۹  
تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

**اهداف:** دفنسین‌ها پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی غنی از سیستمین هستند و Bax یک ژن پروآپوپتوزی بوده که منجر به مرگ سلولی می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر کشت و عصاره باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر میزان بیان ژن بتادفنسین ۲ انسانی و Bax در سلول‌های HT29 بود.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی علوم پزشکی تبریز، در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. در این مطالعه تجربی، رده سلولی HT29 از بانک سلولی پاستور تهیه شد و سلول‌ها پس از کشت با استفاده از روش MTT assay مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA از سلول‌های تیمار شده انجام و تست DNA Ladder assay صورت گرفت و پس از تهیه cDNA، میزان بیان ژن‌های bax و بتادفنسین ۲ در رده سلولی HT29 به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان می‌دهد باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی تکثیر سلول‌های HT29 را مهار می‌کنند و سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شوند. نتایج دیبی و DNA ladder assay حاصل از تیمار سلول‌های HT29 با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی را نشان داد و نتایج Real-time PCR نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی سبب افزایش بیان ژن بتادفنسین و در بازه زمانی ۱۲ الی ۲۴ ساعت در سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌شود و رابطه معنی‌داری پیدا می‌کند ( $P=0/023$ ). نتایج حاصل نشان داد بیان ژن Bax در ۲۴ ساعت اول تغییر معنی‌داری پیدا نمی‌کند ( $P=0/37$ ).

**نتیجه‌گیری:** می‌توان از عصاره باکتری لاکتوباسیل در جهت تحریک سلول‌های سرطان برای تولید بتادفنسین، مهار پاتوژن‌ها، عدم تحریک سیگنالینگ‌های سلولی و مبارزه با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده کرد.

### کلیدواژه‌ها:

لاکتوباسیلوس  
کازئی، ژن بتادفنسین ۲،  
سلول‌های HT29

### مقدمه

نوع اثر پروبیوتیک، به تولید متابولیت‌های فعال از نظر بیوشیمیایی آن‌ها یا مولکول‌های موجود بر سطح این میکروارگانیسم‌ها یا اجزای مترشحه از آن‌ها بستگی دارد [۸، ۷]. به طور کلی، پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی شامل اسید چرب با زنجیره کوتاه مثل استات، لاکتات، سوکسینات، بوتیرات، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و ترکیب‌های باکتریوسین تولید می‌کنند که هم روی باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر می‌گذارند [۹، ۱۰]. دفنسین‌ها پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی غنی از سیستمین هستند که به عنوان عضوی از سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در نظر گرفته می‌شوند؛ چراکه قادر به فراخوانی مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها هستند و در القای تولید سایتوکاین‌های مختلف نقش مؤثری دارند [۱۱]. دفنسین‌ها توسط گروه‌های مختلفی از سلول‌ها از جمله نوتروفیل‌ها و سلول‌های ترشحی روده تولید می‌شوند و

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی متشکل از میکروارگانیسم‌های همسفره زنده هستند که پس از هضم، سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشند و مزایای زیادی برای میزبان به همراه دارند [۲، ۱]. این میکروارگانیسم‌های زنده که به عنوان پروبیوتیک مصرف می‌شوند، کارایی درمانی زیادی برای انسان به همراه دارند، به طوری که در درمان اسهال ناشی از باکتری‌های پاتوژن روده‌ای مانند سندرم روده تحریک‌پذیر و سرطان‌های کولون نقش دارند [۴، ۳]. نقش پروبیوتیک‌ها در تعدیل پاسخ ایمنی می‌تواند به علت تأثیر این میکروارگانیسم‌های مفید زنده روی ترشح بعضی سایتوکاین‌ها و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ذاتی باشد [۶، ۵].

\* نویسنده مسئول:

دکتر چنگیز احمدی‌زاده

نشانی: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه میکروبیولوژی.

تلفن: ۴۰۳۰۴۶۴ (۹۱۰) ۹۸+

پست الکترونیکی: ch\_ahmadizadeh@iau\_ahar.ac.ir



مطالعات اوگوشی<sup>۱</sup> و همکاران حاکی از آن است که چندین باکتری پروبیوتیک پاتوژنیک از جمله لاکتوباسیل‌ها ایمنی ذاتی را از طریق القای دفسنسن القا می‌کنند. گزارش شده است سویه‌های بیماری‌زای *Salmonella ssp* و هلیکوباکتر پیلوری نیز باعث تحریک بیان hBD-2 می‌شوند [۲۲]. اجزای باکتریایی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیکی بیان دفسنسن را القا می‌کنند و بنابراین بر فعالیت ضدباکتریایی روده تأثیر می‌گذارند. در نتیجه، القای دفسنسن‌ها توسط پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیل‌ها ممکن است یک استراتژی درمانی جدید برای تقویت مکانیسم‌های دفاعی ذاتی باشد [۲۳]. هدف از این پژوهش، تأثیر باکتری لاکتوباسیل کازنی بر بیان ژن بتا دفسنسن و *bax* در سلول‌های سرطانی HT29 و تعیین امکان ترشح بتادفسنسن از سلول‌های HT29 است.

### 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 و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. به منظور شناسایی دقیق گونه لاکتوباسیل مورد استفاده، ابتدا گونه مورد نظر با استفاده از روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. محیط کشت MRS برات حاوی باکتری‌ها را به تیوب‌ها منتقل وبا ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۸۰۰ ماکرولیتزر لیز بافر به تیوب‌ها افزوده شد. سپس تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد تیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر منهای ۷۰ درجه قرار داده و دوباره در بن ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد ۷۰۰ ماکرولیتزر محلول کلروفرم ایزوآمیل الکل به هر کدام از تیوب‌ها افزوده شد. سپس تیوب‌ها سانتریفیوژ شد و مایع رویی تیوب‌ها که حاوی DNA بود به تیوب‌های جدید انتقال داده شد. دوبرابر حجم نمونه‌ها ایزوپروپانل سرد به تیوب‌های جدید اضافه شد و تیوب‌ها به مدت یک شبانه‌روز در فریزر منهای ۷۰ درجه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی بیرون ریخته شد. سپس ۵۰ ماکرولیتزر آب مقطر دیونیزه DNase free به هر کدام از تیوب‌ها افزوده شدند. بعد از اینکه DNAها استخراج شد، ابتدا ارزیابی پرایمرها و سفارش آن‌ها برای سنتز انجام شد.

به منظور بررسی اثر کشندگی عصاره سلولی باکتری لاکتوباسیل کازنی روی رده سلولی HT29 از روش رنگ سنجی MTTSigma (Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میکروگرم در میکرولیتر از عصاره سلولی باکتری کشته‌شده در فاصله زمانی ۲۴ ساعت روی رده سلولی

در *in vitro* فعالیت ضد میکروبی وسیعی را علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت، قارچ‌ها و ویروس‌ها انجام می‌دهند [۱۲]. از میان این ترکیبات، به دلیل اهمیت بالای بتادفسنسن ۲ انسانی در تقویت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی و اثرات آن روی نوتروفیل‌ها که خط اول دفاعی در سیستم ایمنی هستند، بسیار مورد مطالعه قرار می‌گیرد [۱۲]. پرو بیوتیک‌ها ارگانسیم‌های زنده‌ای هستند که با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات مفیدی را بر روی سلامت میزبان اعمال می‌کنند و عموماً از منابع انسانی بوده و غیر بیماری‌زا محسوب می‌شوند. مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها کاملاً شناخته‌شده نیست، ولی مکانیسم‌هایی برای توجیه اثرات پیشگیری‌کننده و درمانی آن‌ها در بیماری‌های انسان پیشنهاد شده است [۱۳].

مطالعه‌ها نشان داده است که پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب موتاسیون‌ها و ترکیب القاکننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند [۱۴، ۱۵]. به طور کلی، سرطان یک بیماری نامتناجس ژنتیکی است که پس از بیماری‌های قلبی-عروقی دومین علت شایع مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود. یکی از شایع‌ترین نوع 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 [۱۶]. در آزمایش‌های برون‌تنی نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها در سرکوب زخم‌های نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ در مدل‌های موش نقش دارند [۱۷]. همچنین یکی از مکانیسم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها، خاصیت ضد تکثیر سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است [۱۸]. بنابراین با پروبیوتیک‌درمانی سرطان، می‌توان با دو مکانیسم رشد سرطان را مهار کرد. اول با مهار مستقیم رشد باکتری‌های پاتوژن‌ها توسط خود پروبیوتیک‌ها و دوم مهار غیرمستقیم با تحریک ترشح بتادفسنسن و پپتیدهای ضد میکروبی توسط سلول‌های انسانی [۱۹].

Bax یک ژن پروآپوپتوزی است که منجر به پیشبرد مرگ سلولی می‌شود و پروتئین Bax سبب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌ها می‌شود [۲۰]. در شرایط عادی Bax عمدتاً از طریق انتقال مجدد از میتوکندری به سیتوزول به وسیله انباشت سطح Bax سمی در غشای بیرونی بیضه میتوکندری جلوگیری می‌کند. تحت شرایط استرس، یک تغییر سازگاری رخ می‌دهد که باعث انتقال به غشای میتوکندریایی می‌شود که منجر به آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود که پس از آن باعث آپوپتوز می‌شود. [۲۱].

1. Ogushi

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

ژن	پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعات bp
Beta defencine	Forward	F:5- GAT GCG TCC ACC AAG AAG- 3	۱۲۲
	Reverse	R:5- AGT TGA AGT TGC CGT CAG-3	
GAPDH	Forward	F: 5 -CGGTGGATCCCCTTTATTG-3	۱۰۶
	Revers	R: 5-CTAACCCAGGAATCCGATG-3	
Bax	Forward	F:TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3	۱۰۱
	Revers	R-AGCTCTTGGTGGACGCATC -3	

## افق دانش

جدول ۲. برنامه ترموسایکلر

فرایند	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال سازی اولیه	۹۴	۱۰ دقیقه	۱
جداسازی	۹۴	۱۵ ثانیه	۴۰
	۵۹	۳۰ ثانیه	
اتصال و جذب نوری	۷۲	۲۵ ثانیه	
طولیل سازی	۷۲	۵ دقیقه	۱

## افق دانش

### استخراج RNA

در ابتدا کل RNA های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (Fermantaz, Germany) طبق دستور العمل آن استخراج شد و غلظت آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (O) اندازه گیری شد.

### سنتز cDNA

ساخت مولکول های DNA مکمل با کیت (Fermantaz, Germany) انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار oligo ۵ طراحی و توسط وبسایت NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov BLAST شدند و اطلاعات آن ها در جدول شماره ۱ موجود است. پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند.

### انجام Real-time quantitative-PCR

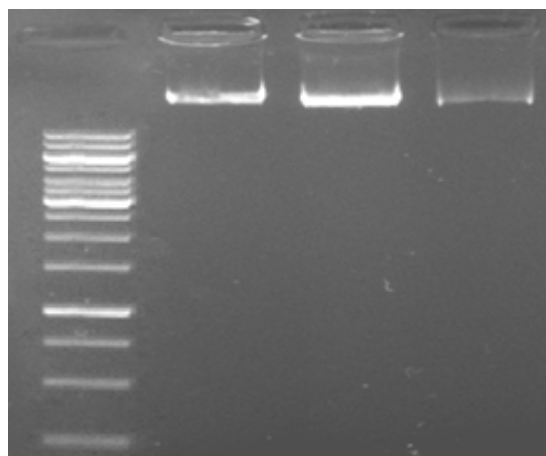
واکنش Real time PCR (BIO-RAD iQ5, USA) به صورت تکرارهای سه تایی و طبق برنامه دمایی که اطلاعات آن در جدول شماره ۲ موجود است، صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب های مخصوص Real time PCR ۱ ماکرولیتر cDNA و ۱۹ ماکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیتر پرایمر فوروارد (۰/۲ ماکرو مولار)، ۱ ماکرولیتر پرایمر ریورز (۰/۲ ماکرو مولار)، ۷ ماکرولیتر DEPC و ۱۰ ماکرولیتر Mastermix 1x Real time

HT29 تیمار شدند. بعد از گذشت زمان فوق محتوای چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT اضافه شد و به مدت چهار ساعت تحت شرایط CO<sub>2</sub> ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. سپس رنگ MTT جداسازی شد و کریستال های فورمازان تولید و به وسیله سلول های زنده در ایزوپروپانول حل شدند.

### رنگ آمیزی سلولی دبی (Dapi staining)

برای بررسی مستقیم اثرات عصاره کشته شده باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و خود باکتری زنده بر سلول های HT29، بعد از کشت سلول ها و تکثیر سلول ها در پلیت شش خانه ای، غلظت های مختلف باکتری های کشته شده و نیز خود باکتری زنده به اندازه بیست برابر سلول ها داخل هر چاهک پلیت شش خانه ای همراه چاهک های مش دار ریخته شد. محتویات سپس ۲۴ ساعت با باکتری تیمار شدند و با افزودن ۶۰ ماکرولیتر پارافرمال دهید ۴ درصد به هر چاهک، باکتری را فیکس کرده سپس مایع رویی سلول ها را خالی کردیم. سلول های داخل هر چاهک با PBS، سه بار شست و شو شدند و سلول های داخل هر چاهک با محلول نفوذپذیر کننده Triton x-100 ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شدند.

2. MicrocultureTetrazoliumTest



### افتخ دانش

تصویر ۱. DNA استخراج شده برای نمونه باکتری پس از سینگل گیری بر روی ژل اگارز ۲ درصد

ریخته شد. بعد تیوبها در دستگاه Real time PCR قرار گرفت و دستگاه run شد.

۱.

### آنالیز اطلاعات بیان ژنی

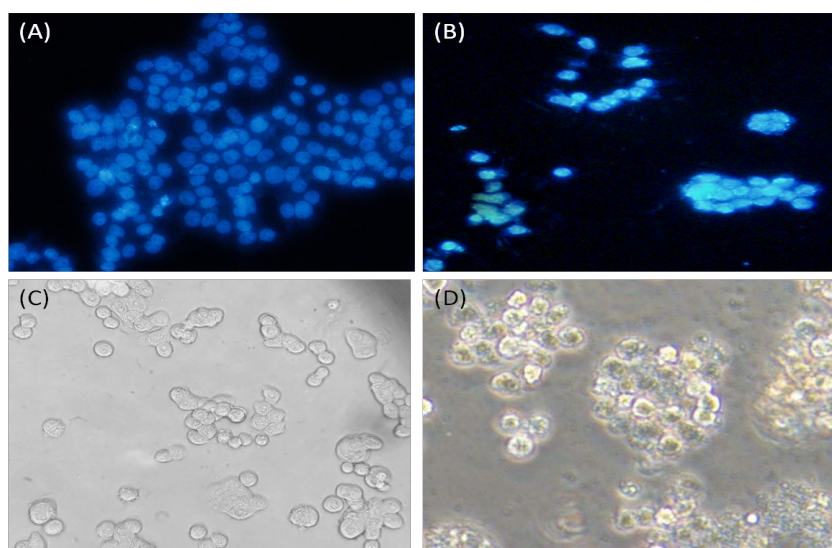
$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

### یافته‌ها

استخراج DNA باکتری لاکتوباسیلوس کازئی طبق پروتکل ذکر شده در قسمت مواد و روشها انجام شد. همان طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، باند شارپ DNA در

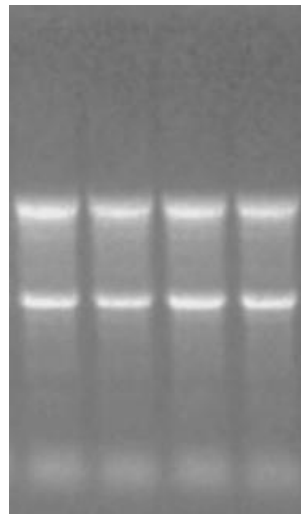
سیکل آستانه (CT) برای هر کدام از نمونهها تعیین شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژنهای مربوطه و ژن GAPDH محاسبه شد. این محاسبه در نمونههای تیمار شده نسبت به نمونه کنترل که به وسیله میزان بیان ژن GAPDH نرمالایز شده، با استفاده از فرمول ارائه شده توسط pfaffl انجام شد. فرمول محاسبات به شرح ذیل است (فرمول شماره ۱).

3. Cycle Threshold



### افتخ دانش

تصویر ۲. تصویر میکروسکوپی سلولهای HT29. سلولهای HT29 در حضور باکتری زنده مسیر آپوپتوز را انتخاب کرده‌اند. A: رنگ آمیزی dapi و تصویر میکروسکوپی فلورسنت هسته‌های سلول سالم و کنترل. B: رنگ آمیزی dapi و تصویر میکروسکوپی فلورسنت هسته‌های سلول تیمار شده و آپوپتوز. C: تصویر میکروسکوپی سلولهای کنترل D: تصویر میکروسکوپ نوری سلولهای آپوپتوز.



## افق دانش

تصویر ۳. تصویر زیر واحدهای 28S، 5S و 18S حاصل از الکتروفورز ANR استخراجی جهت کنترل کیفیت ANRهای استخراج شده

و ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. پس از تیمار سلول‌ها با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، مشاهده شد سلول‌ها به سمت آپوتوز حرکت می‌کنند. احتمال بیان ژن بتادفنسین در سلول‌ها به صفر می‌رسید، سلول‌های سرطانی کولون در کشت همجوار و با رن گامیزی هسته که نشان‌دهنده آپوتوز این سلول‌ها است.

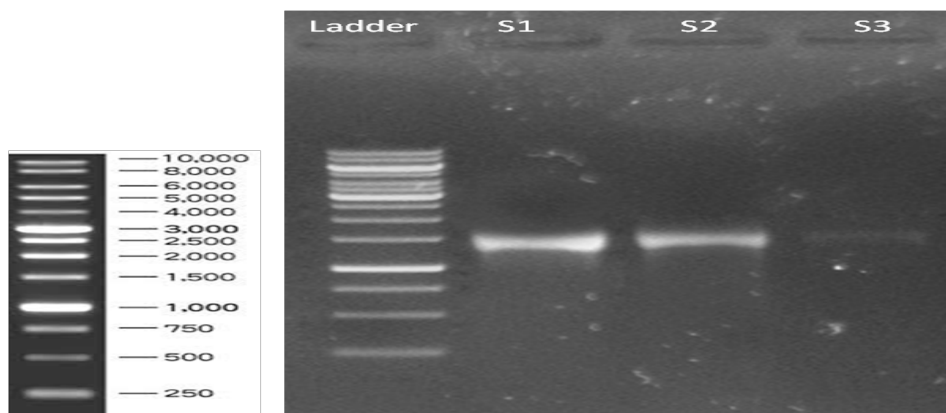
همچنین طبق روش ذکر شده در فصل مواد و روش‌ها پس از تیمار سلول‌ها به منظور بررسی آپوتوز سلول‌ها رنگ‌آمیزی dapi انجام شد. تصویر شماره ۲ سلول‌های رنگ‌شده و غیررنگ‌شده توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت تصویربرداری شده را نشان داده است.

## ارزیابی کیفی RNA استخراج شده

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها، بعد از تیمار HT29 باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره سلولی آن، اقدام به

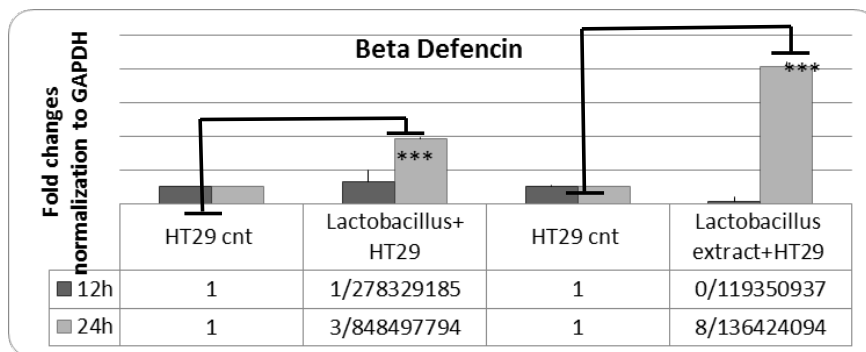
الکتروفورز آگارز مشاهده می‌شود. با استفاده از دستگاه نانو دراپ، کمیت و کیفیت DNA ارزیابی شد. DNA بیشترین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر دارد و بیشترین طول موج جذب RNA و پروتئین به ترتیب ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر است و همان‌طور که در شکل حاصل از نتایج دستگاه نانو دراپ (تصویر شماره ۱)، نشان داده شده است، همه نمونه‌های DNA استخراجی از کمیت و کیفیت بالا برخوردار بوده و بالاترین پیک جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر است.

در این پژوهش، به دو روش، سلول‌های سرطانی تیمار شدند. در روش اول تیمار سلول‌ها به مدت چهار ساعت به صورت کشت همجوار در داخل پلیت‌های حاوی ترانسفرول با منافذ ۰/۱ میکرومتری و سپس حذف ترانسفرول حاوی باکتری انجام شد و روش دوم کشتن باکتری‌ها با گرم و سرد کردن پشت سر هم و تیمار سلول‌ها انجام شد. در هر دو تیمار مدت ۱۲ ساعت



## افق دانش

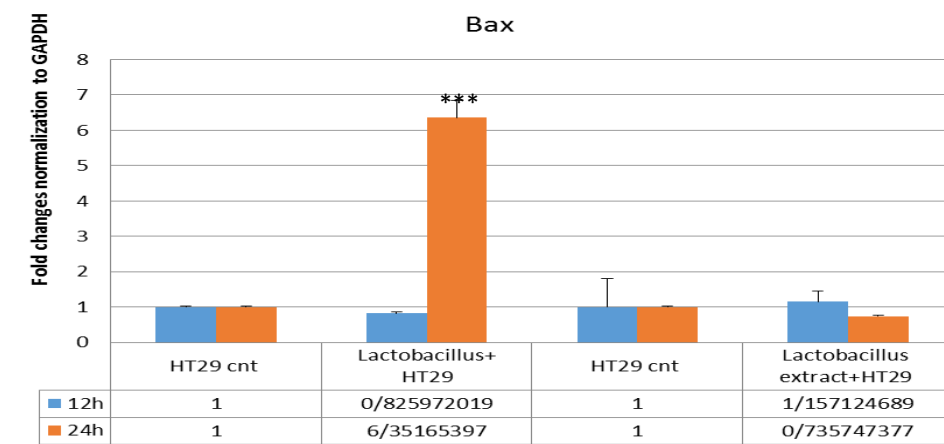
تصویر ۴. انجام الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد برای محصول RNA ۱۶S. همان‌طور که در شکل آمده است باند شارپ چاهک دوم (S1) اختصاصی و شارپ بوده و برای توالی‌یابی مناسب است.



### افتخ دانش

تصویر ۵. نمودار میزان بیان ژن بتا دفنسنین. سلول های HT29 تحت تأثیر باکتری های لاکتوباسیلوس به صورت تکی، به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

(P=۰/۰۲۳)



### افتخ دانش

تصویر ۶. نمودار میزان بیان ژن Bax در سلول های HT29 تحت تأثیر باکتری های لاکتوباسیلوس (اعداد به دست آمده میانگین سه بار تکرار هستند) P=۰/۳۷

## بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد با افزایش بیان ژن بتادفنسنین در مواجهه با عصاره کشته شده لاکتوباسیل کازئی و باکتری زنده، باکتری توانایی تحریک تولید بتادفنسنین انسانی را از سلول های کولون دارا بوده و خود باکتری به صورت زنده باعث القای اپوپتوز سلول های سرطانی می شود و همچنین بیان ژن Bax در بازه زمانی ۱۲ ساعت اول تغییر معنی داری نشان نداد. مکانیسم اثر پروبیوتیک ها کاملاً شناخته شده نیست، ولی مکانیسم هایی برای توجیه اثرات پیشگیری کننده و درمانی آن ها در بیماری های انسان پیشنهاد شده است که از آن جمله می توان به تولید ترکیبات مهار کننده باکتری ها، تقویت سیستم ایمنی و نیز تحریک تولید پپتیدهای ضد میکروبی دفنسنین از خود سلول های انسانی اشاره کرد [۱۳]؛ بنابراین احتمال پروبیوتیک درمانی سرطان می تواند با دو مکانیسم، رشد سرطان را مهار نماید. اول با

استخراج RNA از سلول های HT29 تحت تیمار با باکتری وعصاره سلولی آن شد و سپس غلظت RNA نمونه ها با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. جهت سنجش کیفیت RNA های استخراج شده، نمونه ها روی ژل الکتروفورز شدند (تصویر شماره ۳).

## نتایج واکنش زنجیره ای Real Time PCR

برای انجام این آزمایش سلول ها در پلیت های شش خانه ای با غلظت های IC50 کشت داده شدند و با باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و عصاره سلولی آن تیمار شدند که نتایج در تصویر شماره ۴ دیده می شود.

میزان بیان ژن های Bax و beta defencin در کشت همجوار سلول های سرطانی کولون HT29 با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در تصویرهای شماره ۵ و ۶ نشان داده شده است که به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت (P=۰/۳۷).

باکتری کشته شده با حرارت را تأیید کرد [۲۸].

ستاری و احمدی زاده، به بررسی میزان بیان ژن های PTEN و AKT1 در کشت همجوار سلول های سرطانی کولون HT29 با باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس پرداختند. نتایج نشان داد باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس میزان بیان ژن AKT1 را کاهش و بیان PTEN را افزایش داده و سلول های سرطانی را به سمت آپوپتوز می برد. آزمایش MTT نشان داد که غلظت  $OD=0/05$  بیشترین کشندگی طی چهار ساعت را دارد [۲۹]. طبق مطالعه انجام شده توسط تاونیتی و همکاران، سویه های باکتریایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازنی سبب کاهش درصد بقای سلول سرطانی HT29 و Caco-2 می شوند. نتایج این محققان نشان داد که اجزای سلولی باکتری کشته شده با حرارت مانند دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان هم دارای اثرات سیتوتوکسیک در برابر سلول های سرطانی هستند که با مطالعه ما هم خوانی دارد [۳۰].

یان و همکاران نیز با تحقیق های خود نشان دادند که ترکیب های محلول ترشح شده از لاکتوباسیلوس کازنی و لاکتوباسیلوس رامنوسوس باعث القای آپوپتوز در سلول های لوکمیای مونوسیتی می شوند؛ در نتیجه می توان پروبیوتیک را به عنوان عاملی ایمن برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ گونه عارضه جانبی در پی ندارد و این با مطالعه ما هم خوانی دارد [۳۱].

نتایج حاصل از تحقیق های بیالدوین و همکاران نشان داد که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازنی می توانند باعث افزایش القای آپوپتوزیس در رده سلولی کارسینوما LS315 شوند و به عنوان ادجوانت با شیمی درمانی به کار گرفته شوند که نتایج مطالعه مطابق با نتایج حاصل است [۳۲]. در مطالعه علی اصغری و همکاران اثرات عصاره سلولی باکتری لاکتوباسیلوس کازنی در افزایش بیان ژن پرو آپوپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن Bcl2 در سلول سرطانی کولون و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی نشان داده شد که با مطالعه ما هم خوانی دارد [۳۳]. نتایج مطالعه عبدالان و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان می دهد که عصاره آبی برگ گیاه مازو بومی، دارای اثر توکسیسیته علیه رده سلولی HT29 بوده و می تواند سبب القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن آپوپتوتیک Bax در سلول های HT29 شود که با مطالعه ما هم خوانی دارد [۳۴].

### نتیجه گیری

با وجود تحریک تولید بتادفنسین انسانی توسط عصاره کشته شده باکتری لاکتوباسیل، می توان از عصاره این باکتری ها در جهت تحریک سلول های سرطان برای تولید بتادفنسین، مهار پاتوزن ها، عدم تحریک سیگنالینگ های سلولی تکثیر و مبارزه با باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک استفاده کرد.

مهار مستقیم رشد باکتری های پاتوزن ها توسط خود پروبیوتیک ها و دوم مهار غیرمستقیم با تحریک ترشح بتادفنسین و پپتیدهای ضد میکروبی توسط سلول های انسانی. پپتیدهای ضد میکروبی دارای ۱۰ تا ۱۵۰ اسید آمینه هستند که عملکرد ضد میکروبی آن ها بستگی به عوامل مختلفی مانند pH، فراوانی پپتید و غلظت نمک دارد [۱۹]. پروتئین های ضد میکروبی به صورت نرمال از بخش های مختلف بدن مانند پوست، موکوس روده، موکوس دهان، مسیر تنفسی، چشم و سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نیز تولید می شوند، اما بیان این پروتئین ها در شرایط عفونی مانند زخم ها یا التهاب ها به صورت القایی افزایش می یابد. این پپتیدها عمدتاً غشاهای میکروبی را مورد هدف قرار می دهند، در نتیجه به واسطه قابلیت کاربرد، آن ها، آنتی بیوتیک های نسل جدید به شمار می روند [۲۴].

یک دسته از این پپتیدها دفنسنین ها هستند که به سه گروه آلفا، بتا و تتا تقسیم می شوند. بتادفنسین ها یکی از بزرگ ترین اعضای این خانواده هستند و رونوشت آن ها در بسیاری از مهره داران، بی مهرگان و گیاهان یافت می شود. بیشتر دفنسنین ها شش ریشه سیستئین دارند که برای فعالیت ضد میکروبی ضروری نیست، اما مقاومت بالایی نسبت به پروتئولیز باکتریایی را ایجاد می کنند. دفنسنین ها در سلول ها و بافت های فراوان وجود دارند که در دفاع میزبان ضد عفونت های میکروبی درگیر هستند [۲۵]. ژن Bax یک نقطه ورود منحصر به فرد برای مسیر سیگنالینگ آپوپتوز درونی است. این مسیر توسط محرک های مختلف از جمله محرومیت سیتوکین و استرس سیتوتوکسیک آغاز می شود و در نهایت سبب القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول ها می شود [۲۶].

سلطان دلال و همکاران، اثر باکتری های پروبیوتیک روی بیان ژن های TLR2 و TLR4 و در سلول های HT29 عفونی شده با سالمونلا انتریتیدیس را مورد مطالعه قرار دادند. یافته ها نشان داد پس از تیمار سلول های سالم و غیر عفونی HT29، با هر یک از دو باکتری پروبیوتیک، بیان ژن های TLR2-4 به طور چشمگیری افزایش داشت. برخلاف آن، میزان بیان این دو ژن در سلول های آلوده به سالمونلا انتریتیدیس، پیش و پس از درمان با هر یک از باکتری های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازنی به صورت معناداری کاهش یافت [۲۷]. کریمی اردستانی و همکاران به شناسایی مولکولی باکتری پروبیوتیک کشته شده با حرارت و بررسی آپوپتوزیس القا شده توسط باکتری بر رده سلول HT-29 سرطان کولون پرداختند. لاکتوباسیلوس برویس در الگوی وابسته به زمان و دُز، بقا و تکثیر سلول های سرطانی کولون رده HT-29 را کاهش داد که بیشترین اثر سیتوتوکسیته مربوط به رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت بود. درصد زیستایی در دُز و زمان در سلول های HT29 و HEK293 به ترتیب ۲۳ و ۵۰ درصد برآورد شد. آزمون قطعه قطعه شدن DNA هم، القای آپوپتوزیس توسط

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه طبق نامه تأییدیه به شماره ۵۹۸۴ به تاریخ ۱۳۹۸/۰۹/۱۸ مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاهی قرار گرفته است.

### حامی مالی

این مطالعه در قالب پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم مینا یآوری، مصوب دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر است.

### مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

## References

- [1] Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2006; 7(2):73-89. [PMID]
- [2] Karamese M, Aydin H, Sengul E, Gelen V, Sevim C, Ustek D, et al. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model. *Iranian Journal of Immunology*. 2016; 13(3):220-8. [PMID]
- [3] Korterink JJ, Ockeloen L, Benninga MA, Tabbers MM, Hilbink M, Deckers-Kocken JM. Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica*. 2014; 103(4):365-72. [DOI:10.1111/apa.12513]
- [4] Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe Journal*. 2011; 17(6):369-74. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2011.03.010] [PMID]
- [5] Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Náhui Palomino RA, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-candida activity. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0131220. [DOI:10.1371/journal.pone.0131220] [PMID] [PMCID]
- [6] Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- $\beta$  expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One*. 2014; 9(8):e105370. [DOI:10.1371/journal.pone.0105370] [PMID] [PMCID]
- [7] Zavala L, Golowcyc MA, van Hoorde K, Medrano M, Huys G, Vandamme P, et al. Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells in vitro. *Beneficial Microbes*. 2016; 7(4): 585-95. [DOI:10.3920/BM2015.0196] [PMID]
- [8] Golowcyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 118(3):264-73. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042] [PMID]
- [9] Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Beneficial Microbes*. 2015; 6(2):209-17. [DOI:10.3920/BM2014.0067] [PMID]
- [10] Bernstein CN. Antibiotics, probiotics and prebiotics in IBD. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*. 2014; 79:83-100. [DOI:10.1159/000360713] [PMID]
- [11] Schröder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999; 31(6):645-51. [DOI:10.1016/S1357-2725(99)00013-8]
- [12] Tomalka J, Azodi E, Narra HP, Patel K, O'Neill S, Cardwell C, et al.  $\beta$ -Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. *Journal of Immunology*. 2015; 194(4):1788-95. [DOI:10.4049/jimmunol.1203239] [PMID] [PMCID]
- [13] Bhattacharyya S, Ghosh SK, Shokeen B, Eapan B, Lux R, Kiselar J, et al. FAD-I, a *Fusobacterium nucleatum* cell wall-associated diacylated lipoprotein that mediates human beta defensin 2 induction through Toll-like receptor-1/2 (TLR-1/2) and TLR-2/6. *Infection and Immunity*. 2016; 84(5):1446-56. [DOI:10.1128/IAI.01311-15] [PMID] [PMCID]
- [14] Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. *Microbiology and Immunology*. 2014; 58(9):492-502. [DOI:10.1111/1348-0421.12175] [PMID]
- [15] Hassan Z, Mustafa S, Rahim RA, Isa NM. Anti-breast cancer effects of live, heat-killed and cytoplasmic fractions of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus hominis* isolated from human breast milk. *Journal of Molecular Oncology*. 2016; 52(3):337-48. [DOI:10.1007/s11626-015-9978-8] [PMID]
- [16] Tauriello DVF, Calon A, Lonardo E, Batlle E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Molecular Oncology*. 2017; 11(1):97-119. [DOI:10.1002/1878-0261.12018] [PMID] [PMCID]
- [17] Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44 Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*. 2014; 30:51-9. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.08.009] [PMID]
- [18] Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nature Communications*. 2016; 7:12365. [DOI:10.1038/ncomms12365] [PMID] [PMCID]
- [19] Rengaraj D, Truong AD, Lillehoj HS, Han JY, Hong YH. Expression and regulation of avian beta-defensin 8 protein in immune tissues and cell lines of chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2018; 31(9):1516-24. [DOI:10.5713/ajas.17.0836] [PMID] [PMCID]
- [20] Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, et al. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(21):14764-75. [DOI:10.1074/jbc.M602374200] [PMID] [PMCID]
- [21] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of bax from the cytosol to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*. 1997; 139(5):1281-92. [DOI:10.1083/jcb.139.5.1281] [PMID] [PMCID]
- [22] Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, et al. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces hu beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(32):30521-6. [DOI:10.1074/jbc.M011618200] [PMID]
- [23] Schlee J, Harder B, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008; 151(3):528-35. [DOI:10.1111/j.1365-2249.2007.03587.x] [PMID] [PMCID]
- [24] Meade KG, O'Farrelly C.  $\beta$ -defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:3072. [DOI:10.3389/fimmu.2018.03072] [PMID] [PMCID]
- [25] Bayer A, Lammel J, Rademacher F, Groß J, Siggelkow M, Lippross S, et al. Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 2016; 25(6):460-5. [DOI:10.1111/exd.12966] [PMID]
- [26] Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study. *Chemistry Central Journal*. 2007; 1:13. [DOI:10.1186/1752-153X-1-13] [PMID] [PMCID]
- [27] Soltan Dallal MM, Moshiri M, Mirshafiey A, Douraghi M, Rezaie F, Gholami M. [Evaluation of the effect of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 on the TLR2 and TLR4 expression in HT29 cells infected with *Salmonella enteritidis* (Persian)]. *Tehran University of Medical Journal*. 2019; 76(11): 724-30. <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-9383-fa.html>
- [28] Karimi Ardestani S, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. [Molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line (Persian)]. *Iranian Journal of Microbiology*. 2016; 10(2):42-52. <http://ijmm.ir/article-1-521-fa.html>



- [29] Sattari S, Ahmadizadeh C. [The study of expression of PTEN and AKT1 genes in co-culturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus* (Persian)]. *Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2018; 22(6): 624-31. <http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3648-en.html>
- [30] Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept. *Journal of Genetics and Nutrition*. 2011; 6(3):261-74. [DOI:10.1007/s12263-011-0218-x] [PMID] [PMCID]
- [31] Yan F, Brent Polk D. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(52): 50959-65. [DOI:10.1074/jbc.M207050200] [PMID] [PMCID]
- [32] 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. *Journal of Nutrition and Cancer*. 2010; 62(3):371-8. [DOI:10.1080/01635580903407197] [PMID]
- [33] Ali Asgari E, Mirzaie A, Noorbazargan H, Bagheri Kashtali A. [Cytotoxicity effect of *Lactobacillus casei* cell extract as indigenous probiotic bacterium on colon cancer cell line (HT29) and analysis of bax and Bcl2 apoptosis gene expression (Persian)]. *Armaghan-e-Danesh*. 2017; 21(12):1192-206. <http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-1673-fa.html>
- [34] Abdalan S, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. [Evaluation of anti-cancer effect of aqueous and hydroalcoholic extracts of quercus fectoria leaf against colon cancer HT29 cell line (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018; 21(4):48-57. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5491-fa.html>

This Page Intentionally Left Blank