

بررسی اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی بر رفتار سلول‌های توموری کولورکتال

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱۳

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها باکتری‌های فلور نرمال هستند که در صورت مصرف کافی علاوه بر فواید تغذیه‌ای، دارای فواید بهداشتی نیز خواهند بود. این فواید بهداشتی که شامل جلوگیری از اسهال‌های باکتریایی، آگزماهای پوستی و به تازگی جلوگیری و حتی کنترل سرطان‌های مختلف نیز می‌باشد. تاکنون مکانیسم‌های مختلفی مثل تحریک سیستم ایمنی، تعدیل ترکیب جمعیت فلور نرمال دستگاه گوارشی، ادراری و تناسلی و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های سرطان‌زای مدفوعی برای اثرات پروبیوتیک‌ها شناسایی شده است. با توجه به تراکم بالای فلور نرمال در روده و ماهیت اکثر تک‌گیر سرطان‌های کولورکتال، این سرطان‌ها جزو کاندیداهای اصلی درمان با پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند. در این مطالعه اثرات مستقیم پروبیوتیک لاکتوباسیلی بر سلول‌های توموری مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: از کشت باکتری‌ها، مایع رویی و عصاره باکتریایی تهیه شده و سلول‌ها توسط این مواد تیمار شدند. تاثیر این مواد بر تکثیر سلولی با استفاده از روش Microculture Tetrazolium Test (MTT)، نکروز سلولی با استفاده از بررسی (Lactate Dehydrogenase assay (LDH assay) و آپوپتوز سلولی با استفاده از بررسی میزان فعالیت کاسپاز سه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مایع رویی لاکتوباسیل‌ها باعث کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز سلول‌ها می‌شود اما بر میزان نکروز سلولی تاثیری ندارد. اما هنگامی که سلول‌های سرطانی در معرض عصاره لاکتوباسیل‌ها قرار می‌گیرند، این عصاره‌ها علاوه بر کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز سلولی منجر به نکروز سلول نیز می‌شود.

نتیجه‌گیری: استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی باعث کاهش تکثیر سلول‌های توموری کولورکتال در مراحل اولیه سرطانی می‌شود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، سرطان کولورکتال، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی.

محمد مهدی سلطان‌دلال^{۱،۲*}

مجید مجرد^۳، زهره صالحی‌پور^۱،
هدی عطاپور مشهد^۴، رضا رئوفیان^۳،
زهرارجبی^۱

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبی‌شناسی،
دانشگاه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران،
تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی مواد غذایی،
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۴- گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشکده بهداشت، دانشگاه
علوم پزشکی تهران
تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۲۹۷۱
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

مقدمه

اولسراتیو، اسهال، اکتوپیک آگزما و غیره به اثبات رسیده است.^{۱-۴} در سال‌های اخیر، مطالعه‌هایی در جهت استفاده از پروبیوتیک‌ها در پیشگیری، کنترل و حتی درمان سرطان‌های مختلف، به‌خصوص پستان و دستگاه گوارش انجام شده است.^{۵-۷} با توجه به ماهیت، محل قرارگیری و تراکم موضعی میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش (تراکم ۱۰^{۱۱} Cfu/gr در محتویات روده‌ای)، سرطان کولورکتال (CRC) یکی از گزینه‌های اصلی برای استفاده از

پروبیوتیک (Probiotic) واژه‌ای است که به میکروارگانیزم‌های بی‌ضرری اطلاق می‌شود که در صورت مصرف کافی، علاوه بر فواید تغذیه‌ای، دارای فواید بهداشتی نیز خواهند بود. از سال ۱۹۵۳ که این واژه برای اولین بار مورد استفاده قرار گرفت، تاکنون موارد متعددی از اثرات مثبت مصرف پروبیوتیک‌ها در مقابله با مواردی شامل کولیت

پاسخ به درمان با 5-fluorouracil است.^{۱۶} علاوه بر این مصرف خوراکی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس منجر به ارتقا سطح ایمنی میزبان از طریق افزایش سطح IgG و IgM سرمی و هم‌چنین IgA موکوس دستگاه گوارش می‌شود.^{۱۶-۲۰} سوالی که با توجه به نتایج این مطالعه‌ها در ذهن مطرح می‌شود، این است که آیا پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی به طور مستقیم اثرات مهاری بر رشد سلول‌های توموری القای می‌کنند؟ برای پاسخ به این سوال، در این مطالعه اثر باکتری‌های لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس سوش استاندارد شماره ATCC 4356 و لاکتوباسیلوس کازئی سوش استاندارد شماره ATCC 39392 در مهار تکثیر سلول‌های سرطان کولورکتال CaCo-2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

آماده‌سازی محیط کشت سلول حاوی عصاره باکتریایی و مایع‌روبی کشت باکتری: سویه استاندارد لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (ATCC 4356) و لاکتوباسیلوس کازئی (ATCC 39392) از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و بیماری‌زا از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به صورت لئوفیلز تهیه شده و در محیط MRS آگار کشت داده شد. کلونی باکتری‌های رشد کرده روی آگار به محیط de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck Cat. No.1.10660.0500) مایع منتقل شده و به صورت شبانه کشت داده شد. سپس ۱ ml از کشت شبانه در ۵۰ ml محیط کشت تازه MRS مجدداً کشت داده شده و در دمای ۳۷ °C با دور ۲۵۰ انکوبه شدند. جذب نوری محیط کشت به صورت دوره‌ای در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد تا میزان جذب محیط کشت باکتری به یک برسد. با استفاده از سانتی‌فیوژ به مدت پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ RPM، باکتری‌ها رسوب داده شدند. محلول رویی با استفاده از فیلتر با منافذ ۰/۲۲ μm استریل شد. در مرحله بعد این محلول با محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS ۱۰٪ مخلوط شده و درصدهای مختلف ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ از آن تهیه شد. از محیط کشت حاوی MRS با غلظت‌های یاد شده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از باکتری رسوب داده شده در ۳ ml محلول 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) سوسپانسیون تهیه شده و باکتری‌ها با استفاده از Ultrasonic bath لیز شدند. در مرحله بعد این عصاره از فیلتر ۰/۲۲ μm عبور داده شده و استریل گردید. این

پروبیوتیک‌ها به نظر می‌رسد.^۸ سرطان کولورکتال، سومین سرطان شایع در میان انسان‌ها است. این سرطان به طور کلی جزو سرطان‌های خوش‌خیم محسوب می‌شود، به طوری که بیماران مبتلا به مراحل اولیه این سرطان دارای بقا پنج ساله به میزان ۶۳٪ می‌باشند. با این حال سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جمعیت‌های انسانی می‌باشد.^{۹، ۶} علت اصلی پیشنهاد شده در توجیه این تناقض این واقعیت است که اکثر بیماران مبتلا به این بیماری در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند و در نتیجه بقا این بیماران به شدت کاهش می‌یابد به طوری که، بقا با تشخیص متاستاز در این بیماران تا ۱۰٪ کاهش می‌یابد.^۶ درمان‌های رایج کانسر کولورکتال عبارتند از جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی که همگی باعث کاهش کیفیت قابل ملاحظه زندگی فرد بیمار می‌شود. از سوی دیگر از آن‌جا که اکثر بیماران در فاز متاستاتیک شناسایی می‌شوند، به نظر می‌رسد که باید استراتژی موثرتری در تشخیص، درمان و هم‌چنین پیشگیری (پروفیلاکسی) این سرطان اتخاذ نمود. با توجه به ماهیت غالباً تک‌گیر این سرطان، اثرات عوامل محیطی در ایجاد و پیشرفت این سرطان بسیار مهم به نظر می‌رسد. یکی از عوامل محیطی مهمی که روند ایجاد سرطان‌های کولورکتال را تسهیل می‌نماید، ایجاد التهاب روده توسط فلور نرمال روده‌ای می‌باشد. مطالعه‌ها بر روی مدل‌های حیوانی مستعد برای ایجاد التهاب، این فرضیه را تایید نموده است.^{۱۱} باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB) یا لاکتوباسیل‌ها یکی از باکتری‌های شایع مورد استفاده در صنایع لبنی می‌باشند. بعضی از سوش‌های LAB به عنوان پروبیوتیک شناخته شده‌اند و به صورت تئوری با تحریک سیستم ایمنی، منجر به جلوگیری از ایجاد سرطان کولورکتال می‌شود. با توجه به نکات ذکر شده طی دهه گذشته مطالعات متعددی بر روی اثرات بهداشتی شیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) و لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) انجام شده است.^{۱۱-۱۴} نتایج این مطالعات نشان دهنده اثرات مثبت این پروبیوتیک‌ها در جلوگیری از ایجاد اسهال‌های ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک در بیماران بستری بود. علاوه بر این، مصرف این پروبیوتیک‌ها منجر به کاهش شیوع اسهال‌های ناشی از کلستریدیوم دی‌سیل می‌شد.^{۱۵} مطالعه‌ها بیش‌تر بر روی این دو سوش لاکتوباسیلوس نشان‌دهنده اثرات مثبت این پروبیوتیک‌ها در افزایش آپوپتوز سلول‌های توموری کولورکتال در

اندازه‌گیری میزان آپتوز سلولی: به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر القای آپتوز در سلول CaCo-2، با استفاده از کیت رنگ سنجی فعالیت پروتئین کاسپاز سه ساخت (Sigma Co, Germany) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده میزان فعالیت پروتئین کاسپاز سه مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، تعداد پنج هزار سلول CaCo-2 در هر چاهک از پلیت کشت سلولی ریخته شده و به مدت یک شب کشت داده شد. سپس محیط کشت با محیط Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI1640) فاقد سرم تعویض شده و سلول‌ها به مدت یک شب تحت هم‌زمان‌سازی قرار گرفتند. در نهایت این محیط با محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ و غلظت‌های مختلف سوپرناتانت و یا عصاره باکتری تعویض شده و سلول‌ها به مدت ۱۶ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سلول‌های تیمار شده با استفاده از Cell scraper جمع‌آوری شده و با استفاده از محلول IX PBS سرد شستشو داده شدند. پلیت سلولی حاصله با نسبت یک میلیون سلول در میلی‌لیتر، در بافر لیز کننده حل شده و با استفاده از دوره‌های منجمد و ذوب کردن متوالی کاملاً لیز شد. این محلول به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور و در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. محلول رویی برداشته شده و با استفاده از دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ غلظت پروتئینی نمونه تعیین و یکسان‌سازی گردید. مقدار ۵μl از محلول پروتئین با ۸۵μl از بافر اندازه‌گیری مخلوط شده و به این محلول مقدار ۱۰μl از Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) افزوده شد. محلول حاصله در پلیت ۹۶ خانه ریخته شده و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. در نهایت جذب نوری محلول در طول موج ۴۰۵ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

بررسی میزان تکثیر سلولی: اثرات مایع رویی سوش‌های لاکتوباسیلوس بر قدرت تکثیر سلولی سلول‌های سرطانی در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این بررسی با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده در مورد غلظت‌های کنترل MRS، تفاوت معنی‌داری با محیط RPMI نشان ندادند (نتایج نمایش داده نشد)، در محاسبه‌ها از غلظت‌های MRS به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همان‌طور که از

سوسپانسیون در محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS ۱۰٪ حل شده و غلظت‌های ۱٪ و ۵٪ تهیه شد.

کشت سلولی: رده سلولی سرطان کولورکتال (CaCo-2) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شده و با استفاده از محیط کشت RPMI1640 حاوی FBS ۱۰٪ و آمپی‌سیلین (Mast, Ampicillin England) با غلظت ۱۰۰μg/ml در دمای ۳۷°C و فشار CO₂ ۵٪ کشت داده شدند.

بررسی میزان تغییرات تکثیر سلولی: تعداد ده هزار سلول پس از شمارش در هر چاهک پلیت کشت سلول ۹۶ خانه ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از هم‌زمان‌سازی سلول‌ها با استفاده از تخلیه محیط از FBS به مدت یک شب، سلول‌ها به مدت یک شب با استفاده از غلظت‌های مختلف مایع رویی، محیط باکتری‌ها و یا عصاره سلولی باکتری تیمار شدند. بعد از این مدت به هر چاهک مقدار ۱۰μl محلول MTT با غلظت ۵mg/ml اضافه شده و سلول‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شدند. سپس محیط سلول‌ها تخلیه و سلول‌ها در ۱۰۰μl محلول ایزوپروپانل اسیدی (اسید کلریدریک ۰/۰۴ مولار در ایزوپروپانل) به‌طور کامل لیز شده و جذب نوری محلول رنگی حاصله در طول موج ۵۷۰ نانومتر با فیلتر زمینه ۶۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

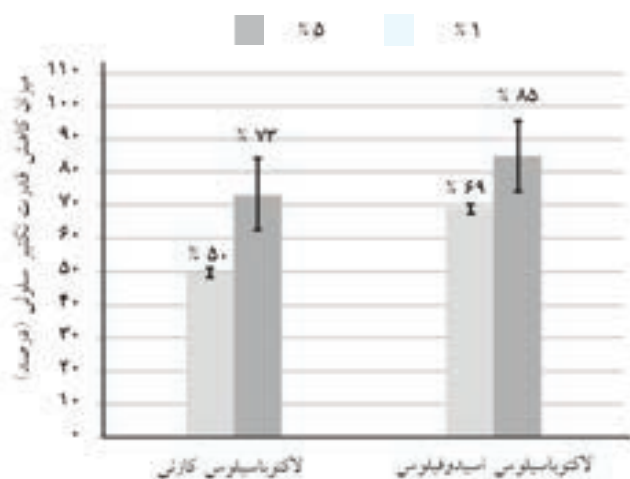
بررسی میزان نکروز سلولی: پس از تیمار سلول‌ها همانند مرحله قبلی (به‌جز استفاده از محیط RPMI حاوی FBS ۵٪)، میزان نکروز سلول‌ها بر اساس میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های در حال نکروز اندازه‌گیری شد. آزمایش با استفاده از کیت بررسی میزان Lactate Dehydrogenase assay (LDH assay) ساخت (Sigma Co, Germany) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با تغییرات جزئی انجام شد. به اختصار، پس از تیمار سلول‌ها، پلیت به مدت چهار دقیقه در دور ۲۵۰g سانتریفوژ شده و ۵۰μl از محلول رویی به پلیت دیگری منتقل شد. به این محلول مقدار ۱۰۰μl از محلول بررسی میزان فعالیت آنزیم (متشکل از نسبت‌های مساوی محلول سوسترای LDH، محلول رنگ و محلول کوفاکتور آنزیم) افزود شد. پلیت در داخل فویل آلومینیوم پیچیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۵μl محلول اسید کلریدریک یک نرمال متوقف شده و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر در مقابل فیلتر زمینه ۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

حاوی مقادیر بالای آنزیم لاکتیک اسید دهیدروژناز می‌باشد، برای به حداقل رساندن خطا در اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، از محیط کشت RPMI حاوی FBS ۵٪ برای کشت سلول‌ها استفاده شد. هم‌چنین از این محیط به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی اثرات سوپرناتانت بر القای مرگ سلولی از طریق القای نکروز در نمودار ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، هیچ‌یک از غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه (در مقایسه با کنترل MRS با غلظت مشابه) باعث افزایش معنی‌داری در نکروز سلولی نشدند. البته با افزایش درصد سوپ‌های سلولی میزان نکروز سلولی نیز افزایش می‌یابد، با این حال این افزایش نکروز در موارد افزایش درصد MRS نیز دیده می‌شود. نتایج بررسی اثرات عصاره باکتریایی بر ایجاد نکروز در نمودار ۴ آورده شده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود، تیمار سلول با این مواد باعث افزایش میزان نکروز سلولی می‌شود که این اثرات، در بین دو سوش مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

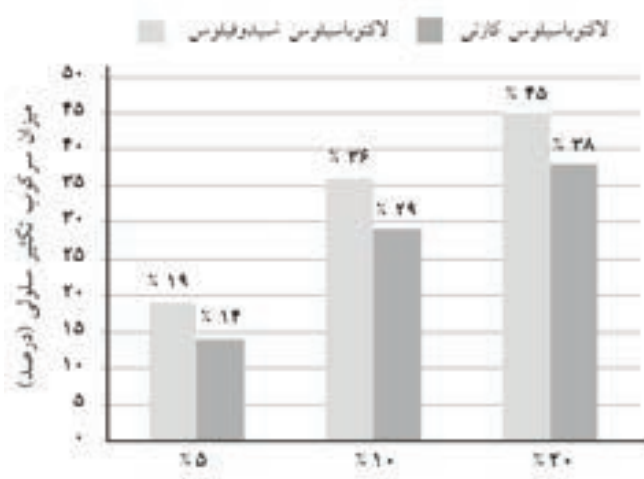
نتایج بررسی القای آپوپتوز: بررسی میزان آپوپتوز سلولی در نمودار ۵ آورده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، سوپرناتانت و عصاره باکتری باعث القای آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود و این اثر وابسته به دوز می‌باشد. با توجه به این که روند تغییر اثرات آپوپتوتیک

این نمودار بر می‌آید، تیمار سلول‌ها با هر دو سوش لاکتوباسیل منجر به مهار تکثیر سلولی به‌صورت وابسته به دوز (Dose dependent) می‌شود. با این حال اثرات لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در تمام دوزها بیش از اثرات سوش کازئی می‌باشد. با توجه به این که اثر باکتری‌های پروبیوتیک بر سلول‌ها، علاوه بر مواد مترشحه از سلول، ناشی از وجود جسم باکتری نیز می‌باشد. اثرات عصاره باکتریایی بر مهار تکثیر سلولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این بررسی در نمودار ۲ آورده شده است. در این بررسی نیز از غلظت‌های IX PBS در RPMI1640 حاوی Fetal Bovine Serum (FBS) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، تیمار سلول‌ها با عصاره سلولی نیز منجر به کاهش قدرت تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد، که در این مورد نیز سوش اسیدوفیلوس دارای اثرات قوی‌تری نسبت به سوش کازئی می‌باشد.

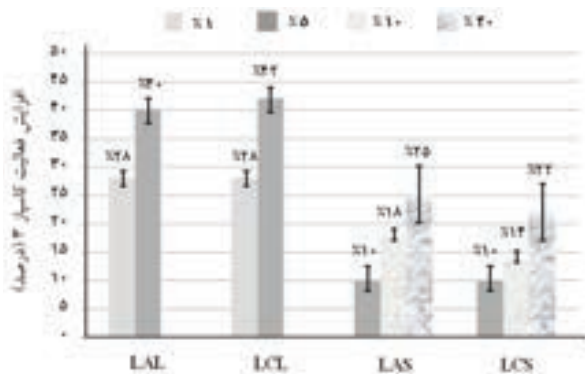
نتایج بررسی نکروز سلولی: با توجه به این که تست Microculture Tetrazolium Test (MTT assay) نشان‌دهنده برآیندی از تکثیر، مرگ و بقای سلول می‌باشد، به منظور تعیین مکانیسم دقیق کاهش تعداد سلول‌ها، اثر عصاره باکتری و هم‌چنین سوپ سلولی در غلظت‌های فوق بر میزان القای آپوپتوز و هم‌چنین نکروز سلول بررسی شد. با توجه به این که FBS مورد استفاده در کشت سلولی



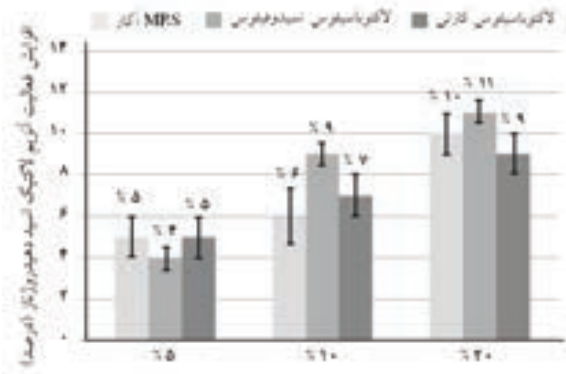
نمودار-۲: اثر مهاری عصاره باکتری لاکتوباسیلوس بر رشد سلول‌های CaCo-2. LA: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، LC: لاکتوباسیلوس کازئی. آزمایشات به‌صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف معیار در نمودارها مشخص گردید.



نمودار-۱: اثر مهاری مایع روی محیط کشت باکتری بر رشد سلول رده سلولی CaCo-2. LA: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، LC: لاکتوباسیلوس کازئی. آزمایشات به‌صورت سه‌تایی انجام شد و انحراف معیار در نمودارها مشخص گردید.

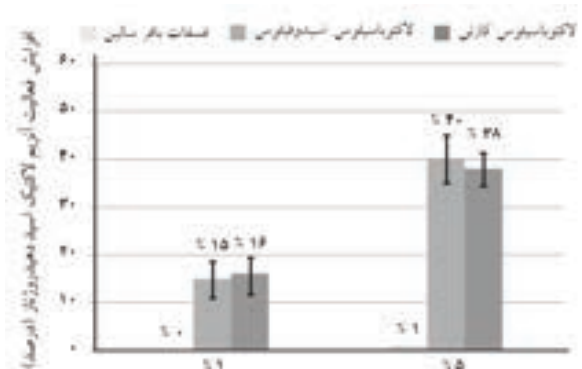


نمودار- ۵: اثرات سوپرناتانت لاکتوباسیلوس بر القای آپوپتوز سلولی. LA لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، LC لاکتوباسیلوس کازئی. آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف معیار در نمودارها مشخص گردید.



نمودار- ۳: اثرات سوپ سلولی لاکتوباسیلوس بر القای نکروز سلولی. LA لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، LC لاکتوباسیلوس کازئی. آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف معیار در نمودارها مشخص گردید.

مفید، با مکانیسم‌های مختلفی منجر به اثرات مثبت بهداشتی برای مصرف‌کننده می‌شوند. این پروبیوتیک‌ها با تولید انواع مواد باکتریوسین باعث تنظیم ترکیب جمعیتی میکروارگانیسم‌های روده و در نتیجه کاهش بروز عفونت‌های باکتریایی می‌شوند،^{۲۱} علاوه بر این پروبیوتیک‌ها از اتصال مواد سمی به دیواره روده نیز جلوگیری می‌کند.^{۲۲} این میکروارگانیسم‌ها فعالیت آنزیم‌های مدفوعی سرطان‌زا هم چون آزرودوکتاز را نیز کاهش می‌دهند و با این مکانیسم از ایجاد ضایعات پیش سرطانی جلوگیری می‌کنند.^{۲۳} در میان تمامی پروبیوتیک‌ها باکتری‌های خانواده لاکتوباسیلوس نظیر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبورکی از جمله مهم‌ترین اجزا فلور نرمال روده انسان و حیوانات می‌باشند.^{۲۴} این باکتری‌ها به طور رایج به‌عنوان پروبیوتیک در ماست و سایر لبنیات استفاده می‌شوند. این باکتری‌ها به عنوان عوامل موثر در تقویت سیستم ایمنی در مصرف‌کنندگان و همچنین افزایش مقاومت میزبان در شرایط و ناهنجاری‌های مختلف مطرح می‌باشند.^{۲۴} اثرات لاکتوباسیل‌ها به‌عنوان عوامل تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی Immunomodulator تنها محدود به جایگاه تجویز آنها یعنی دستگاه گوارش و سیستم لنفوی مزاتریک نبوده و در واقع این عوامل می‌توانند الگوی پاسخ ایمنی کل بدن را تحت تاثیر قرار دهند.^{۱۹،۲۵} علاوه بر این نقش پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر تسهیل درمان سرطان کولورکتال با 5-FU به خوبی شناخته شده است.^{۱۶} با این حال



نمودار- ۴: اثرات عصاره باکتریایی لاکتوباسیلوس بر القای نکروز سلولی. LA لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، LC لاکتوباسیلوس کازئی. آزمایشات به صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف معیار در نمودارها مشخص گردید.

تیمار سلولی با روند تغییرات تکثیر سلولی مشابهت دارد، می‌توان نتیجه گرفت که حداقل بخشی از اثرات مهار لاکتوباسیل‌ها بر تکثیر سلولی، از طریق القای آپوپتوز صورت می‌گیرد.

بحث

مطالعات چند دهه گذشته به خوبی نشان داده است که بعضی از اعضا فلور نرمال دستگاه گوارش علاوه بر تولید متابولیت‌های مغذی

کولورکتال جلوگیری می‌کنند. نتایج به دست آمده در این بررسی می‌تواند نشان‌دهنده این مطلب باشد که لاکتوباسیل‌ها هم به طور مستقیم و با برهم کنش با سلول سرطانی و هم به طور غیرمستقیم از طریق آزادسازی متابولیت‌های موثر در کنترل مسیرهای مسئول تنظیم تکثیر سلولی اثر مهاری بر تکثیر سلولی از خود نشان می‌دهند. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و با توجه به ماهیت رده سلولی CaCo-2 که یک رده سلولی مربوط به مراحل اولیه سرطانی شدن می‌باشد، استفاده از لاکتوباسیل‌های پروبیوتیکی می‌تواند در پیشگیری از بروز سرطان کولورکتال موثر باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثرات آنتی‌پرولیفراتیو، آنتی‌متاستاتیک و القای آپوپتوز گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از انسان و عصاره سیتوپلاسمی آن‌ها بر سل‌لاین‌های کولورکتال کانسر" مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۸/۲/۲۷ به کد ۸۹۸۶ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

مطالعات انجام شده بر روی اثرات پروبیوتیک‌ها بر رفتار تکثیری سلول‌های مختلف نتایج متناقضی داشته است. به عنوان مثال در حالی که مخلوط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازئی منجر به حساسیت سلول توموری کولورکتال رده LS513 به درمان با ماده 5-Fluorouracil و القای آپوپتوز می‌شود،^{۱۶} تیمار سلول‌های رویانی با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌شود.^{۲۶}

در توجیه این تناقض‌ها می‌توان گفت که تکثیر سلولی در تمامی سلول‌ها تحت کنترل دو عامل بیان پروتئین‌های سلولی از یک سو و ژن‌های سرکوب‌گر تومور از سوی دیگر می‌باشد. با توجه به این‌که در سلول‌های مختلف، مسیرهای متفاوتی در تنظیم تکثیر سلولی نقش بازی می‌کنند، بالطبع اثرات پروبیوتیک‌ها بر سلول‌های مختلف متفاوت خواهد بود. در مطالعه حاضر نشان داده شد که اثرات مفید لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک منحصر به تقویت سیستم ایمنی نبوده و این پروبیوتیک‌ها به طور موثری از تکثیر سلول‌ها سرطانی

References

1. Sanges M, Valente G, Rea M, Della Gatta R, De Franchis G, Sollazzo R, et al. Probiotics in spondyloarthropathy associated with ulcerative colitis: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13(3):233-4.
2. Wildt S, Nordgaard I, Hansen U, Brockmann E, Rumessen JJ. A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2011;5(2):115-21.
3. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*;21(2 Pt 2):e386-93.
4. 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.
5. Chen CC, Lin WC, Kong MS, Shi HN, Walker WA, Lin CY, et al. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br J Nutr* 2011;1-12.
6. Yazdi MH, Soltan Dallal MM, Hassan ZM, Holakuyee M, Agha Amiri S, Abolhassani M, et al. Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour. *Br J Nutr* 2010;104(2):227-32.
7. Ohgashi S, Hoshino Y, Ohde S, Onodera H. Functional outcome, quality of life, and efficacy of probiotics in postoperative patients with colorectal cancer. *Surg Today* 2011;41(9):1200-6.
8. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000;1(1):13-24.
9. Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A, Young GP. A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr* 2005;135(5):996-1001.
10. Lee JS, Paek NS, Kwon OS, Hahm KB. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: a novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(1):194-202.
11. de Vrese M, Kristen H, Rautenberg P, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. *J Dairy Res* 2011;78(4):396-403.
12. Patrignani F, Burns P, Serrazanetti D, Vinderola G, Reinheimer J, Lanciotti R, et al. Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Res* 2009;76(1):74-82.
13. Venus C, Goll R, Loken EB, Biong AS, Halvorsen DS, Florholmen J. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *Eur J Clin Nutr* 2008;62(2):299-301.
14. Sendra E, Fayos P, Lario Y, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E, Perez-Alvarez JA. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiol* 2008;25(1):13-21.
15. Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'écuyer A, Savoie M, Franco M, et al. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C11285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2007;21(11):732-6.

16. Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutr Cancer* 2010;62(3):371-8.
17. Haghghi HR, Gong J, Gyles CL, Hayes MA, Sanei B, Parvizi P, et al. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(12):1387-92.
18. Yurong Y, Ruiping S, Shimin Z, Yibao J. Effect of probiotics on intestinal mucosal immunity and ultrastructure of cecal tonsils of chickens. *Arch Anim Nutr* 2005;59(4):237-46.
19. Perdígón G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 4:S21-6.
20. Tejada-Simon MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 1999;82(4):649-60.
21. Elmer GW. Probiotics: "living drugs". *Am J Health Syst Pharm* 2001;58(12):1101-9.
22. Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2000;2(6):681-6.
23. Mountzouris KC, Kotzampassi K, Tsirtsikos P, Kapoutzis K, Fegeros K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on gut microflora metabolic biomarkers in fed and fasted rats. *Clin Nutr* 2009;28(3):318-24.
24. de Moreno de LeBlanc A, Matar C, LeBlanc N, Perdígón G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):R477-86.
25. Roessler A, Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler UC, et al. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy* 2008;38(1):93-102.
26. Li WI, Brackett BG, Halper J. Culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* stimulates proliferation of embryonic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230(7):494-500.

Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on the behavior of colorectal tumor cells

Mohammad Mehdi Soltan Dallal Ph.D.^{1,2*}
Majid Mojarad Ph.D.³
Zohre Salehipour M.Sc.¹
Hoda Atapour Mashhad M.Sc.⁴
Reza Raoofian Ph.D.³
Zahra Rajabi M.Sc.¹

1- Department of Pathobiology, Division of Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4- Department of Chemistry, University of Payam Noor, Mashhad, Iran.

* Corresponding author: Division of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 88992971
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

Abstract

Received: January 03, 2012 Accepted: March 03, 2012

Background: Probiotic microorganisms are living normal flora of human body that have nutritional value and health benefits when administered in adequate amounts. The health benefits include prevention of bacterial diarrhea, skin eczema and recently understood, prevention and control of various cancers, as well. Different mechanisms such as stimulating the immune system, modifying the composition of gastrointestinal and genitourinary tract normal flora and prevention of the carcinogenic activity of fecal enzymes have been identified for their probiotic activity. Due to the high density of the normal flora in the gut and also preferentially sporadic nature of colorectal cancers, these cancers are among the main candidates of treatment trials with probiotics. In this study, direct effects of probiotic lactobacilli on colon cancer tumor cells were studied.

Methods: Supernatant fluid and bacterial extracts were prepared and CaCo-2 cells were treated by these materials. Subsequently, the effects of the aforesaid elements were evaluated on cell proliferation, cell necrosis and cell apoptosis by MTT assay, LDH assay and caspase-3 activity.

Results: The supernatants of lactobacilli decreased cell proliferation and increased cell apoptosis but they did not have any effect on cell necrosis. In contrast, when cancerous cells were treated by lactobacilli extract, it led to cell necrosis in addition to reduction in cell proliferation and increase in cell apoptosis.

Conclusion: The use of lactobacillus probiotics may reduce proliferation of tumor cells in the early stages of colorectal cancers.

Keywords: colorectal cancer, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, probiotic.