

اثر دیپتید-B و لایزت پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن‌های TNF- α و IL-1 در رده‌ی سلول سرطانی معده (AGS) در مقایسه با سلول سالم HEK

شیمیا درخشان^۱، نگار یآوری طهران‌فرد^۱، ناهید ابوطالب^۲، مریم ناصرالاسلامی^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: امروزه می‌توان از ترکیبات طبیعی مانند پپتیدها و پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل درمان بیماری‌هایی چون سرطان نام برد. این ترکیبات با اثر بر برخی مسیرهای مولکولی از جمله التهاب، ممکن است در جلوگیری از پیشرفت و یا درمان سرطان مؤثر باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر دیپتید-B و لایزت پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن‌های TNF- α و IL-1 در سلول‌های سرطانی معده رده‌ی سلولی AGS بود.

روش بررسی: در این مطالعه، سلول‌های HEK و AGS در محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دیپتید-B و لایزت باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم تیمار شدند و برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. درصد زنده‌مانی سلولی با روش رنگ‌سنجی MTT بررسی شد. به‌منظور بررسی‌های مولکولی پس از استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از واکنش تشخیص مولکولی (Real time PCR) بیان نسبی ژن‌های TNF- α و IL-1 ارزیابی گردید و داده‌ها با استفاده از روش آماری آزمون واریانس یک‌طرفه بین گروه‌ها مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج MTT نشان داد که تیمار سلول‌ها با دیپتید-B و لایزت باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی AGS نسبت به سلول کنترل HEK گردید (IC50) و سطح بیان نسبی ژن‌های TNF- α و IL-1 در سلول‌های سرطانی معده که با دیپتید-B، لایزت باکتری و همچنین هردو ماده به‌طور هم‌زمان تیمار شده‌اند نسبت به نمونه کنترل دارای افزایش معنادار بود ($P \leq 0/05$). میزان افزایش بیان معنادار در ژن IL-1 به‌ترتیب برای پپتید ۳۰۰٪ (۴ برابر)، باکتری ۱۰۰٪ (۲ برابر)، پپتید همراه باکتری ۶۵۰٪ (۷ و نیم برابر) و در ژن TNF- α به‌ترتیب برای پپتید ۳۵۰٪ (۴ و نیم برابر)، باکتری ۱۰۰٪ (۲ برابر)، پپتید همراه باکتری ۵۲۰٪ (۶/۲ برابر) بود. بنابراین احتمالاً این ترکیبات با تأثیر بر دیگر مسیرهای مولکولی موجب مرگ سلول‌های سرطانی شده‌اند.

نتیجه‌گیری: باتوجه به این‌که دیپتید-B و لایزت باکتری روی سلول‌های رده‌ی سلولی سالم HEK سمیت معنی‌داری نداشتند و سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی AGS به‌صورت معناداری شدند که این سمیت وابسته به دوز بود، در نظر گرفتن این ترکیبات طبیعی در درمان سرطان معده ممکن است حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، AGS، دیپتید-B، پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، التهاب، ایترلوکین-۱، فاکتور نکروزدهنده تومور

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۱۹

* نویسنده مسئول:

مریم ناصرالاسلامی:

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

Email:

m.naseroleslami@iautmu.ac.ir

۱ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳ استادیار گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

سرطان معده یک مشکل بهداشتی جهانی است و سالانه بیش از ۱ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا می‌شوند. با وجود کاهش جهانی مرگ‌ومیر در طول ۵ دهه گذشته، سرطان معده سومین علت اصلی مرگ‌ومیر است (۱). در سال‌های اخیر به علت افزایش شیوع مرگ ناشی از سرطان و نقص روش‌های شیمی‌درمانی و رادیودرمانی در فرم‌های پیشرفته‌ی سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل آن احساس می‌شود. عوامل زیادی ممکن است در ایجاد سرطان معده نقش داشته باشند؛ مانند: سن بالا، جنسیت (مرد)، قومیت و عوامل ژنتیکی اما این عوامل قابل اصلاح و پیشگیری نیستند (۲). با این حال، عوامل تغذیه‌ای و عوامل رفتاری از قبیل: کشیدن سیگار (۳)، نوشیدن الکل (۴) و همچنین عفونت هلیکوباکتر پیلوری (۵) نیز در ایجاد سرطان معده نقش دارند؛ که این عوامل تا حد زیادی قابل اصلاح و پیشگیری هستند. تاکنون اثر ترکیبات متعددی بر سلول‌های سرطانی مختلف بررسی شده و ترکیبات بسیاری وجود دارد که خواص ضدسرطانی آن‌ها گزارش شده است. از جمله ترکیبات مورد بررسی، مواد طبیعی موجود در طبیعت مانند بعضی پپتیدها و باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد بسیاری از محققان با توجه به این‌که پپتیدها از فعالیت زیستی بالایی برخوردار بوده و هزینه درمانی بسیار کمتری را به بیمار تحمیل می‌کنند، این ترکیبات را کاندیدای خوبی برای درمان بیماری‌ها از جمله سرطان می‌دانند. یکی دیگر از مزایای پپتیدها به عنوان دارو این است که معمولاً چنین داروهایی عوارض جانبی نداشته و به علت داشتن سمیت پایین مشکلی برای بیمار به وجود نخواهند آورد (۶ و ۷). پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) گروهی از عوامل ایمنی هستند که توسط گونه‌های مختلفی از حیوانات، گیاهان و حشرات تولید می‌شوند تا از خود در برابر باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها دفاع کنند (۸-۱۰). پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان داروی ضدسرطان با هدف قرار دادن غشای سلول‌های سرطانی به آن‌ها آسیب وارد می‌کنند اما به غشای سلول‌های نرمال آسیب نمی‌رسانند (۱۱ و ۱۲). در واقع سلول‌های سرطانی در غشای سلولی خود تفاوت‌های معناداری با سلول‌های غیر سرطانی دارند که به هدف گرفتن آن‌ها توسط پپتیدهای ضد میکروبی کمک می‌کند (۱۳). از آن‌جا که سم بند پایان و سفالوپودها به عنوان گنجینه‌ی پپتیدهای فعال زیستی شناخته می‌شوند، جداسازی محصولات طبیعی از این منابع به یک راهبرد رایج برای شناسایی داروهای جدید تبدیل شده است (۱۴). در

مطالعه‌ی Iwasaki و همکاران (۲۰۰۹) چهار پپتید انانتیومری ۹-مر به نام‌های دیپتید A, B, C, D از یک پپتید با ۴۳ زیر واحد براساس سیستم دفاعی حشرات از دو سوسری طراحی و ساخته شدند که این پپتیدها جزو پپتیدهای ضد میکروبی هستند. پپتیدهای دی ۹-مر دامنه‌های متفاوتی از مهار رشد بر روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی نشان داده است. از بین این پپتیدها، دیپتید-B با توالی (RLRLRIGRR-NH₂) بالاترین سمیت سلولی انتخابی را در برابر رده سلولی میلومای موش نشان داد. تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی و سیتومتریک و نانو ذرات فلزی نشان داد که دیپتید-B در ساختار غشای میلومای موش اختلال ایجاد می‌کند؛ درحالی‌که هیچ اثر کشنده‌ای بر روی لکوسیت‌های طبیعی مشاهده نشد. علاوه بر این، یک ارتباط قوی بین تراکم فسفاتیدیل سرین با بار منفی در سطح غشای سلول سرطانی و حساسیت به پپتیدهای دی ۹-مر در رده‌های سلولی سرطانی مشاهده شد. نتیجه این‌که پپتیدهای دی ۹-مر دارای پتانسیل انتخابی سمیت سلولی، وابسته به بار منفی هستند که فسفاتیدیل سرین در غشای سلول سرطانی را هدف قرار می‌دهند (۱۵). از طرفی طیف وسیعی از گونه‌های باکتریایی در اغلب فعالیت‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی و عملکرد دستگاه گوارش نقش دارند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا هستند که می‌توانند التهاب را بهبود بخشند (۱۶). پروبیوتیک‌ها به دلیل ایجاد تعادل میکروبی در روده و معده‌ی انسان مفید می‌باشند؛ همچنین به دلیل عدم عوارض جانبی در درمان بسیاری از بیماری‌ها اهمیت چشمگیری پیدا کرده‌اند (۱۷). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری از سرطان داشته باشد و یا کمک زیادی به درمان‌های رایج حال حاضر آن کند (۱۸). مصرف پروبیوتیک‌ها، مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم می‌تواند بیان miRs های سرکوبگر تومور را افزایش و انکوژن‌ها و ژن‌های هدف آن‌ها را در مدل حیوانی سرطان روده بزرگ کاهش دهد (۱۹). همچنین این پروبیوتیک‌ها با تعدیل میکروبیوتای دستگاه گوارش و پاسخ ایمنی از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (۲۰ و ۲۱). چندین مطالعه بر روی سلول‌های بافت انسانی نشان می‌دهد که بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ممکن است ایمنی را بهبود بخشد و سویه‌های مختلف این باکتری‌ها توانایی تأثیرگذاری بر سیستم ایمنی دارند. برخی می‌توانند با استفاده از گلوبول‌های سفید برای مبارزه با عفونت، ایمنی را تقویت کنند و برخی دیگر می‌توانند با به‌کارگیری

۵ میلی لیتر بافر PBS (Bio-Idea BI-1404-05), شناور گردید. سپس به کمک دستگاه سونیکاتور پروب دار (Hellscher, Germany), سلول‌ها لیز شدند، سپس دانسیته نوری نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. سلول‌های سرطانی AGS (a human gastric adenocarcinoma cell-line) و سلول‌های سالم HEK (Human embryonic kidney epithelial cells) از انستیتو پاستور تهیه شدند. هر رده سلولی به چهار گروه شاهد، تیمار شده با باکتری، تیمار شده با دیپیتید-B و تیمار شده با دیپیتید-B و باکتری به صورت هم‌زمان تقسیم‌بندی شدند که گروه‌های شاهد هیچ‌گونه تیماری نشدند. سلول‌های تیمار شده دوزهای متفاوتی (جدول ۱) از هر ترکیب را که برای این مطالعه تعیین شدند، دریافت کردند. در ادامه به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک سه ترکیب یاد شده رقت‌های درج شده در جدول ۱ تهیه گردید.

سلول‌های تهیه شده در محیط کشت کامل DMEM (Bio-idea (Dulbecco's modified Eagle's medium) (BI-1003) دارای سرم جنین گاوی (FBS) 10٪، آنتی‌بیوتیک‌های (پنی‌سیلین / استرپتومایسین) ۱٪، در اتمسفر ۹۵٪ هوا و کربن دی‌اکسید ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. از ارزیابی MTT به منظور تعیین IC50 استفاده شد. توان زیستی سلول‌های رده AGS تیمار شده با سه ترکیب مورد مطالعه توسط روش MTT، با استفاده از کیت (Bio-idea, BI-2004) برای هر نمونه سه بار تکرار شد. برای به دست آوردن بهترین غلظت جهت تیمار توسط سه ترکیب مورد مطالعه در این آزمایش (پپتید، باکتری، پپتید همراه باکتری)، رده سلولی AGS با تعداد 5×10^3 سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، غلظت‌های مختلفی از پپتید، باکتری و پپتید همراه با باکتری (جدول ۱) به سلول‌ها اضافه گردید و بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید. سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO (Dimethyl sulfoxide) با غلظت ۰/۵ mg/well به رسوب اضافه شد. در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزاریدر (Biotech, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. میزان بقای سلولی بر اساس مقادیر IC50 در مقایسه با سلول‌های کنترل، یعنی سلول‌های AGS و HEK تیمار نشده تصمیم‌گیری شد. به منظور بررسی کمی بیان ژن‌ها، RNA سلولی از سلول‌های تیمار توسط کیت

گلوبول‌های سفید کمتر، التهاب را کاهش دهند (۲۲). مکانیسم‌های مولکولی زیادی در ایجاد و گسترش سرطان دخیل هستند که یکی از این مکانیسم‌ها افزایش التهاب در سلول‌هاست. سلول‌های مسئول التهاب مرتبط با سرطان از نظر ژنتیکی پایدار هستند و سریعاً در معرض مقاومت دارویی قرار نمی‌گیرند؛ بنابراین کاهش التهاب توسط پپتید و پروبیوتیک می‌تواند روش مؤثری برای پیشگیری و حتی درمان سرطان باشد. اینترلوکین‌ها گروهی از سیتوکین‌ها هستند که مسئولیت تنظیم پاسخ‌های التهابی و عفونی را برعهده دارند (۲۳). از بین فاکتورهای التهابی می‌توان به TNF- α ، اینترلوکین ۸ و اینترلوکین ۱ اشاره کرد. اینترلوکین ۸ نقش مهمی در کموناسی و عملکرد لکوسیت‌ها ایفا می‌کند و به صورت محلی در بافت‌های آلوده تولید می‌شود (۲۳). TNF- α واسطه‌ی مهمی در پاسخ‌های التهابی است و فعالیت‌های مهمی را در سیستم ایمنی ایفا می‌کند. این فاکتور در مهار پیشرفت تومور نیز دخالت دارد (۲۴). اینترلوکین 1 (IL-1) نیز فاکتور التهابی دیگری است که به دو شکل IL-1 α و IL-1 β وجود دارد. IL-1، اغلب با TNF) تأثیر می‌گذارد. IL-1 می‌تواند سیستم ایمنی میزبان را تنظیم کند؛ اما تجمع آن عامل مهمی در بروز سرطان به‌شمار می‌رود (۲۵). با توجه به توضیحاتی که در مورد اهمیت التهاب در پیشرفت سرطان و کارآمدی ترکیبات طبیعی در درمان این نوع بیماری‌ها ذکر شد، بررسی اثر مواد طبیعی مانند دیپیتید-B و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن‌های التهابی به‌عنوان مکمل درمان سرطان معده می‌تواند موضوع مهمی باشد.

روش بررسی

طی این تحقیق، توالی دیپیتید-B که براساس سیستم دفاعی دو سوسری طراحی شده بود (۱۵)، جهت سنتز به شرکت پروتئوزنیکس فرانسه ارسال و به صورت پودر خالص دریافت شد. باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (PTCC NO, 1644) از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید و در محیط (MRS (Merck, 110661) (de MAN, ROGOSA and SHARPE) کشت داده شد. سپس در شرایط بی‌هوازی (شرایط بی‌هوازی با جار بی‌هوازی تعبیه شد) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌های باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را در ساتریفیوژ (Sunny, Japan) به مدت ۲ دقیقه و دور ۹۰۰۰ g قرار داده، مایع رویی دور ریخته شد و ۱ گرم (وزن‌تر) سلول باکتری در

کیت Easy cDNA Synthesis Kit (Pars tous, A101161) رونویسی معکوس شد. Total RNA Extraction (parstous, A101231) طبق پروتکل استخراج گردید و توسط

جدول ۱: مشخصات غلظت‌های استفاده شده از سه ترکیب مورد مطالعه

غلظت									واحد	نام ماده
۱	۵	۱۵	۲۰	۳۰	۵۰	۷۵	۱۰۰	۱۵۰	ماکرومولار	دیپتید-B
۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۱/۲۵			میلی گرم/ میلی لیتر	لایزت باکتری
۱+۰/۰۵	۵+۰/۱	۱۵+۰/۱۵	۲۰+۰/۲۵	۳۰+۰/۵	۵۰+۱	۷۵+۱/۲۵			ماکرومولار+ میلی گرم/ میلی لیتر	دیپتید-B + لایزت باکتری

سلول‌های AGS و HEK با غلظت‌های مختلفی (جدول ۱) از دیپتید-B، لایزت باکتری و دیپتید-B همراه با لایزت باکتری تیمار شدند.

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

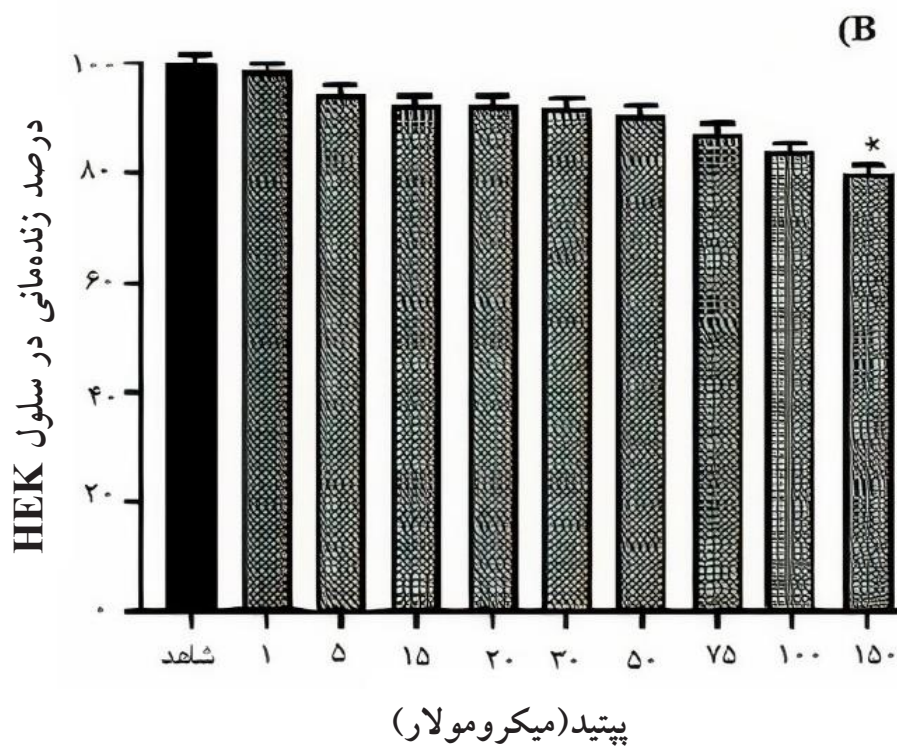
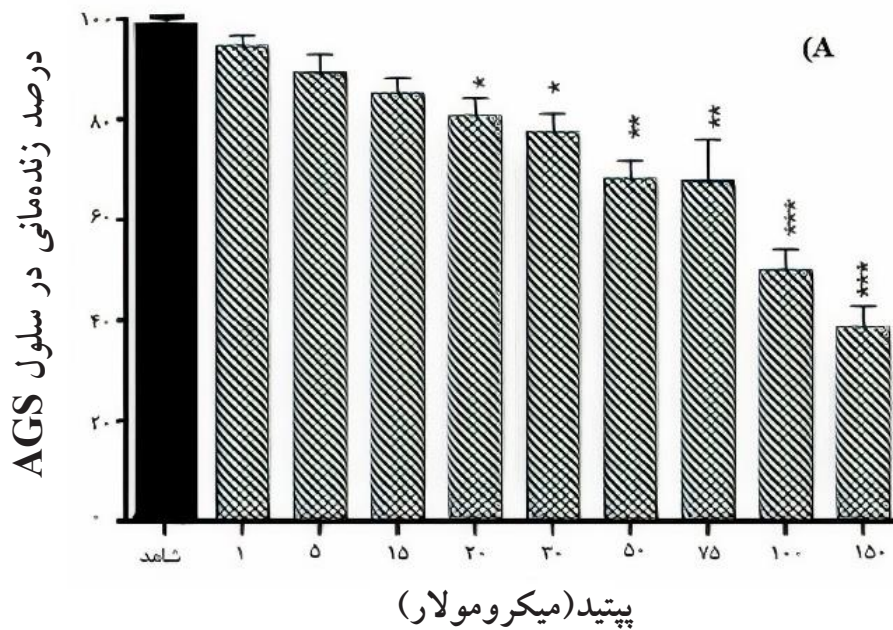
طول قطعه	نام ژن	Forward	Reverse
191 bp	TNF	5'TCCAGGCGGTGCTTGTTCT3'	3'GGCTACAGGCTTGTCACTCG5'
198 bp	IL-1	5'CACCTTCTTTCCCTTCATCTTTG3'	3'CACCACTTGTGTGCTCCATATCC5'
170 bp	GAPDH	5'TGACAACAGCCTCAAGATCATCAG3'	3'GCCATCACGCCACAGTTTCC5'

درصد زنده‌مانی سلول‌های رده‌ی AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف سه ماده‌ی مورد مطالعه (جدول ۱) بعد از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از تست MTT بررسی گردید. نتایج حاصل از این تست حاکی از آن است که دیپتید-B و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، هر کدام به تنهایی قادر هستند که درصد زنده‌مانی سلول‌های AGS را به صورت وابسته به دوز کاهش دهند و با افزایش دوز تیمار از درصد سلول‌های زنده سرطانی AGS در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل کاسته می‌شود، IC50 به ترتیب برای دیپتید-B برابر ۱۰۰ میکرومولار، برای باکتری ۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر و برای ترکیب پپتید و باکتری (به صورت هم‌زمان) ۲۰ میکرومولار از پپتید و ۰/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر از باکتری تعیین گردید. علاوه بر این یافته‌ها نشان داد که اثر ترکیب هم‌زمان دیپتید-B و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم روی کاهش درصد زنده‌مانی رده سلولی AGS بسیار بیشتر از اثر هر کدام از آن‌ها به تنهایی است؛ در حالی که این ترکیب تأثیر معناداری روی درصد زنده‌مانی سلول‌های سالم HEK نداشت.

پرایمرها توسط نرم‌افزار Gene runner طراحی شدند و توسط شرکت سیناکلون سنتز شد. در این پژوهش از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع استفاده شد (محصول این ژن آنزیمی است که در شکستن مولکول قند و تامین انرژی نقش دارد). برنامه زمان-دمایی دستگاه Real Time PCR در سه مرحله تنظیم گردید: ۳ دقیقه در ۹۵°C، ۲۰ ثانیه در ۵۳°C و ۱۰ ثانیه در ۷۲°C در ۴۰ سیکل متوالی بود. Real Time PCR با استفاده از مستر میکس شرکت Amplicon انجام شد. به منظور بررسی‌های آماری از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان می‌شوند و ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی دار نسبت به گروه کنترل هستند ($P \leq 0/05$).

یافته‌ها

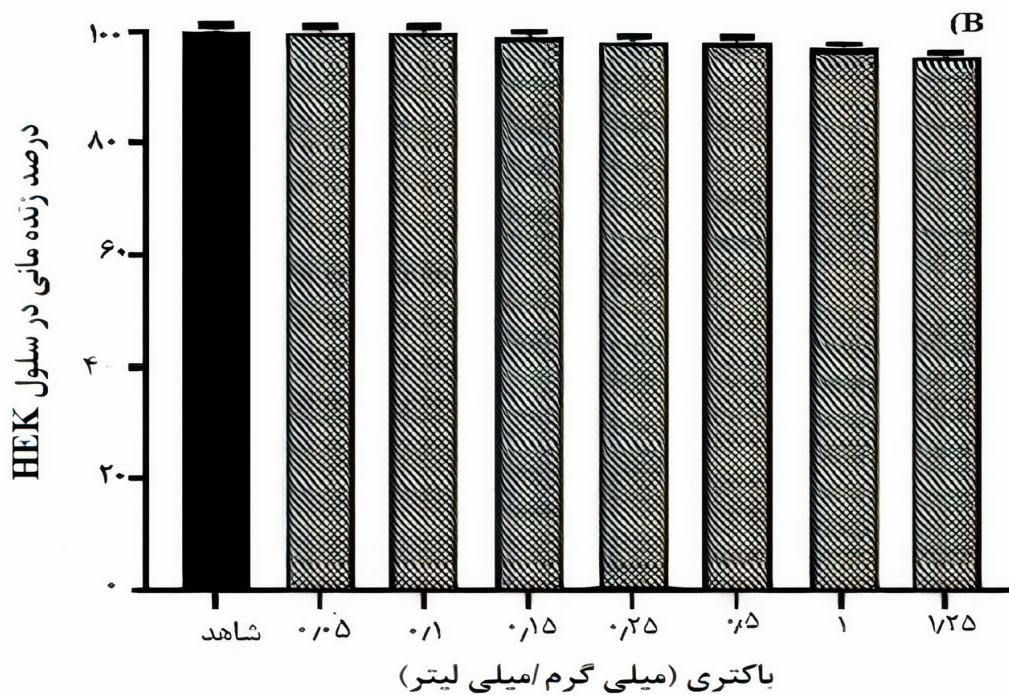
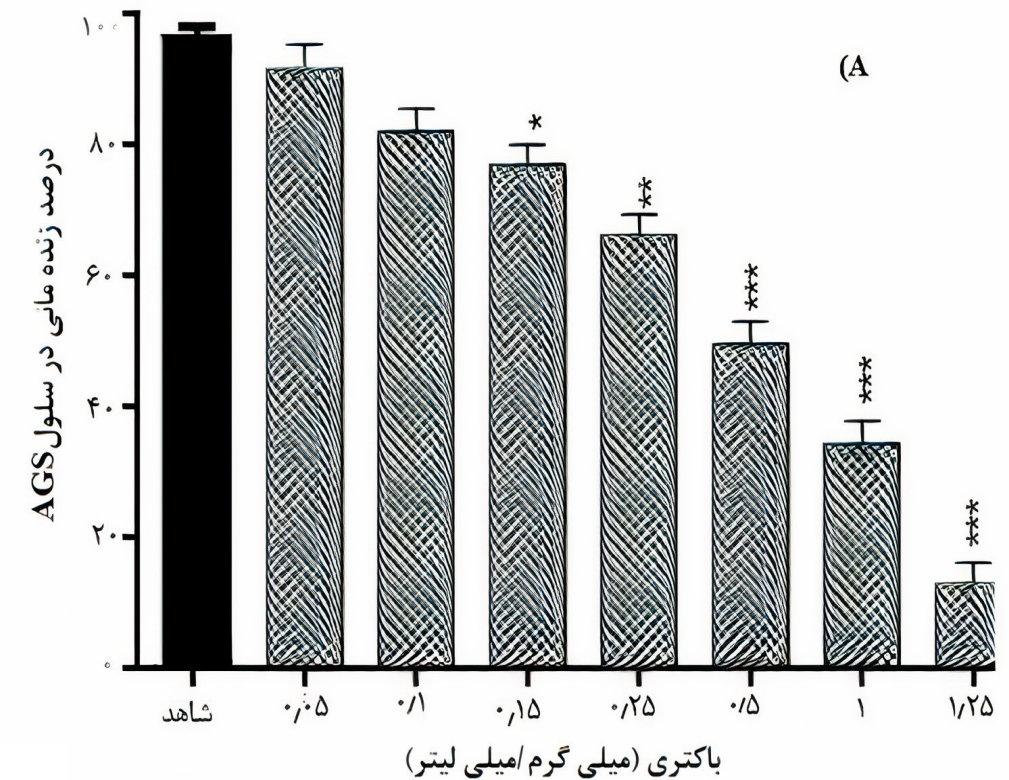
• نتایج سنجش درصد زنده‌مانی



* معنی‌داری آماری داده‌های به‌دست آمده با ANOVA یک‌طرفه را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تمام داده‌ها نشان‌دهنده‌ی میانگین حداقل سه آزمایش مستقل (± انحراف معیار) است. $P < 0.01$, $P < 0.05$ و $P < 0.001$ نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد است.

نمودار A: درصد زنده‌مانی سلول‌های AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف دیپیتید-B در مقایسه با نمودار B.

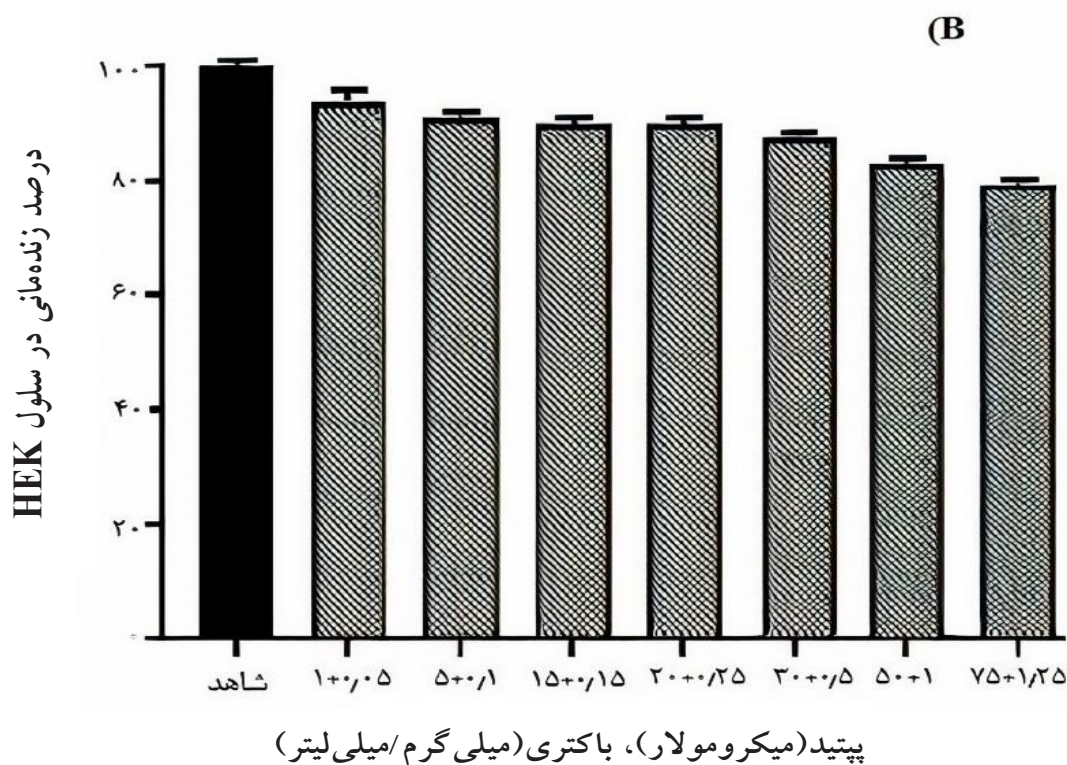
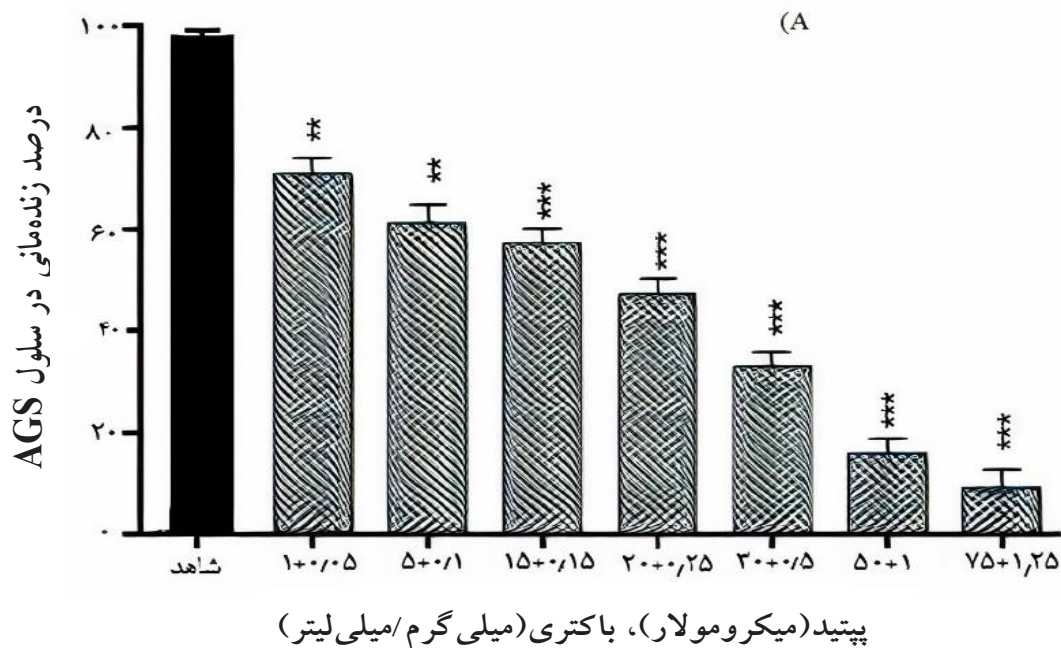
B: درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK تیمار شده با غلظت‌های مختلف دیپیتید-B به مدت ۲۴ ساعت.



* معنی داری آماری به دست آمده با ANOVA یک طرفه را نشان می دهد ($P < 0.05$). تمام داده ها نشان دهنده میانگین حداقل سه آزمایش مستقل (\pm انحراف معیار) است. $P < 0.01$, $P < 0.05$ و $***P < 0.001$ نشان دهنده اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد است.

نمودار ۲: (A) درصد زنده مانی سلول های AGS تیمار شده با غلظت های مختلف باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در مقایسه با نمودار B.

(B) درصد زنده مانی سلول های HEK تیمار شده با غلظت های مختلف باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به مدت ۲۴ ساعت.



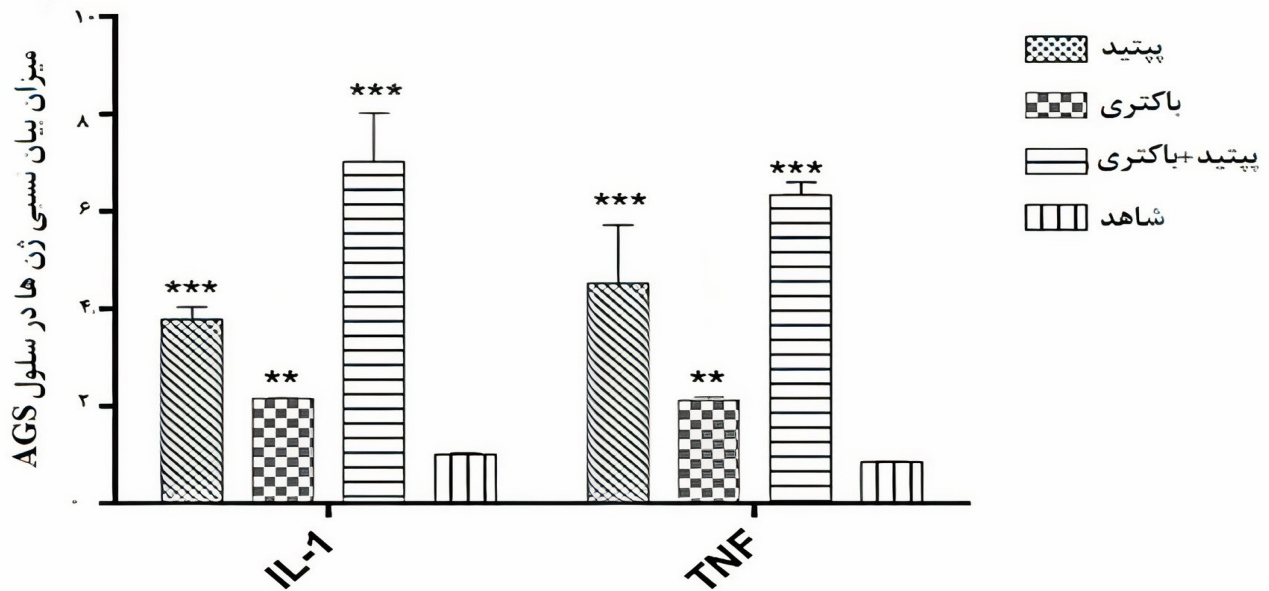
* معنی‌داری آماری داده‌های به‌دست‌آمده با ANOVA یک‌طرفه را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). تمام داده‌ها نشان‌دهنده‌ی میانگین حداقل سه آزمایش مستقل (\pm انحراف معیار) است. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد است.

نمودار (A): درصد زنده‌مانی سلول‌های AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف دیپکتید-B + باکتری بیفیدو باکتری بیفیدو در مقایسه با نمودار B.
 نمودار (B): درصد زنده‌مانی سلول‌های HEK تیمار شده با غلظت‌های مختلف دیپکتید-B + باکتری بیفیدو باکتری بیفیدو به مدت ۲۴ ساعت.

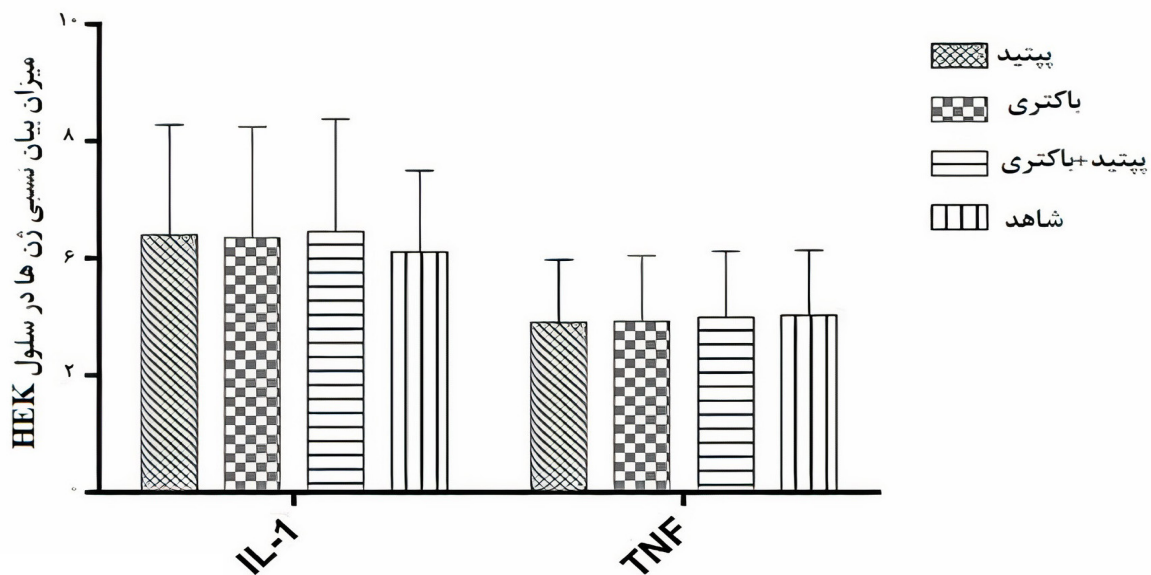
• آنالیز بیان ژن‌های TNF_α و $IL-1$ در رده‌ی سلولی AGS در مقایسه با رده‌ی سلولی HEK

نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن‌های TNF_α و $IL-1$ در سلول‌های

سرطانی معده تیمار شده با دوز IC_{50} سه ترکیب مورد مطالعه دچار افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد گردید؛ در صورتی که این افزایش معنادار در سلول‌های سالم HEK دیده نشد.



نمودار ۴: اثرات سه ترکیب مورد مطالعه بر بیان نسبی ژن‌های $IL-1$ و TNF_α در رده‌ی سلول سرطانی AGS. ** و *** به ترتیب بیانگر اختلاف معنادار $P < 0.05$ و $P < 0.001$ نسبت به گروه شاهد می‌باشد.



نمودار ۵: اثرات سه ترکیب مورد مطالعه بر بیان نسبی ژن‌های $IL-1$ و TNF_α در رده سلولی سالم HEK. در هیچ‌یک از گروه‌ها افزایش یا کاهش معناداری در بیان نسبی ژن‌ها نسبت به شاهد دیده نشد.

مشاهده می‌شود که بیان نسبی ژن‌های $IL-1$ و TNF_α در گروه‌های تیمار شده با دیپتید-B همراه با پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدوم نسبت به دو گروه دیگر افزایش چشمگیری داشته است. در نمودار ۵ که مربوط به سلول سالم HEK

همان‌طور که در نمودارهای ۱ و ۲ و ۳ دیده می‌شود، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی نسبت به گروه شاهد کاهش را نشان می‌دهد که این اختلاف از نظر آماری نسبت به گروه شاهد قابل ملاحظه است ($P < 0.05$). در نمودار ۴

است، هیچ تغییر بیان معناداری نسبت به شاهد دیده نشد.

بحث

در سلول‌های غیرسرطانی به دلیل وجود فسفولیپیدهای دوقطبی، مانند فسفاتیدی‌لکولین، اسفنگومیلین، فسفاتیدی‌لترین و فسفوتیدیل اتیلان‌آمین بار کلی غشای خنثی است. در مقابل، سلول‌های سرطانی این تقارن غشایی را از دست می‌دهند و فسفاتیدی‌لترین‌های آنیونی را در سطح بیرونی غشای پلاسمایی قرار داده و بار منفی کلی را افزایش می‌دهند؛ به همین دلیل پپتیدهای AMPs می‌توانند به صورت اختصاصی به سلول‌های سرطانی حمله کنند (۲۶ و ۱۱) در برخی از مطالعات، اثرات ضدسرطانی و تومورکشی AMPs ها فراتر از فعالیت ضدبیماری‌زایی آن‌ها بیان شده است (۲۷). در تحقیقی که توسط Gonzalez-Montoya و همکاران (۲۰۱۸) انجام شده پپتیدها موجب مرگ سلول‌های سرطانی، کاهش بیان ژن‌های التهابی و سرکوب التهاب شده‌اند. اثرات پروتئین‌های جوانه سویا (GID) که همانند پپتید مورد بررسی در مطالعه‌ی ما از نوع ضد میکروبی هستند به عنوان منبع پپتیدهای ضدسرطانی و ضد التهابی، بر روی سلول‌های سرطانی روده انسانی بررسی شد. نتایج نشان داد که پپتید GID به طور قابل توجهی مولکول‌های پیش التهاب (در ماکروفاژهای القا شده با لپوساکارید) را مهار می‌کند و موجب مرگ سلول‌های سرطانی نیز می‌شود (۲۸). نتایج مطالعات Lehmann و همکاران (۲۰۰۶) و Saido-Sakanaka و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که پپتیدهای ماگنین که از سیستم دفاعی حشرات مشتق شده‌اند، اثرات سیتوتوکسیک را در برابر طیف وسیعی از رده‌های سلولی سرطانی از جمله ملانوم، لنفوم، سرطان خون، سرطان سینه و سرطان ریه نشان می‌دهند (۳۰ و ۲۹). در مطالعه‌ای که توسط Yang و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، اثرات درمانی مجموعه‌ای از آنالوگ‌های پپتیدهای ضد میکروبی (KnFmKn) با سه بلوک آمفیفیل کوتاه سنتز شده بر آدنوکارسینوم ریه انسان بررسی شد که در میان این پپتیدها، K4F6K4 بیشترین فعالیت تومورکشی را نشان داد. همچنین سنجش آپوپتوز سلولی، مشاهدات مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که اختلال غشا، مکانیسم اولیه در عمل ضدتوموری آن بوده است (۳۱). از طرفی نتایج مطالعه‌ی Milajerdi و همکاران (۲۰۱۹) که بر روی پروبیوتیک‌ها و اثرات ضد التهابی آن‌ها انجام شد، حاکی از این بود که برخی از سیتوکین‌های پیش التهابی کاهش قابل توجهی داشتند؛

با این حال غلظت سرمی اینترلوکین-۱۰ به عنوان یک عامل ضد التهابی، به طور قابل توجهی افزایش یافته بود (۳۲) که مشابه نتایج تحقیق حال حاضر است؛ بنابراین مطالعات اندازه‌گیری اثرات پروبیوتیک‌ها بر غلظت سرمی و تغییرات نسبی بیان ژن سایر بیومارکرهای التهابی مورد نیاز است. نتایج مطالعه‌ی Kim و همکاران (۲۰۲۲)، نشان داد که بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس کشته شده با حرارت، آپوپتوز سلول‌های IL-1 سرطان معده انسان را در شرایط آزمایشگاهی القا کردند (۳۳). پروبیوتیک و پپتید مورد بررسی در این مطالعه اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی AGS داشتند اما برخلاف انتظار، باعث افزایش بیان نسبی ژن‌های التهابی IL-1 و TNF- α گردیدند. این امر می‌تواند نشانگر این باشد که دیپپتید-B و بیفیدوباکتریوم احتمالاً با اثر بر مسیرهای التهاب، موجب به راه افتادن دیگر مکانیسم‌های مولکولی مانند آپوپتوز شده و از این طریق موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی شده‌اند و یا ممکن است مستقیماً بر مسیرهای مولکولی دیگر دخیل در سرطان اثر گذاشته و موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی AGS شده باشند. این مطالعه در حیطه‌ی بررسی اثرات غلظت سیتوتوکسیک دیپپتید-B و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در سلول سرطانی معده AGS بر بیان ژن‌های IL-1 و TNF- α در محیط کشت سلولی انجام گرفته است و تفسیر نتایج تنها در حیطه‌ی موضوع فوق امکان‌پذیر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج، نشان داد که دیپپتید-B، پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و همچنین اثر هم‌زمان این دو ماده می‌تواند باعث کاهش بقای سلول‌های سرطانی معده AGS شوند. سلول‌های سالم HEK تیمار شده با هر سه گروه تأثیر چشمگیری در کاهش بقا از خود نشان ندادند. این امر نشانگر این است که اثر هم‌افزایی این دو ترکیب طبیعی می‌تواند تأثیرگذاری را بدون آسیب به سلول‌های سالم افزایش دهد. همچنین افزایش چشمگیر بیان نسبی ژن‌های التهابی IL-1 و TNF- α در سلول‌های AGS دیده شد؛ اما این تغییر بیان در سلول‌های سالم HEK مشاهده نگردید؛ بنابراین احتمال دارد که دیپپتید-B و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم با اثر بر دیگر مسیرهای مولکولی دخیل در سرطان موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شده باشند. تا جایی که پژوهشگران حاضر اطلاع دارند اثر هم‌زمان پپتیدها و پروبیوتیک‌ها بر سرطان تاکنون بررسی نشده است؛ از این روی پیشنهاد می‌شود که اثر دیپپتید-B و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم



و همچنین دیگر پپتیدها و پروبیوتیک‌ها بر مکانیسم‌های دخیل در مهار رشد سلول‌های سرطانی بررسی شود.

اسلامی تهران با عنوان «بررسی اثر دیپتید-B و لایزت پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژن‌های IL-1 و TNF- α در رده سلولی AGS» با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.227 می‌باشد. بدین وسیله از همکاران محترم دانشگاه علوم پزشکی ایران که این طرح در آن به انجام رسیده، تقدیر و تشکر می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی آزاد

References

1. Thrift AP & El-Serag HB. Burden of gastric cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2020; 18(3): 534-42.
2. Poorolajal J, Moradi L, Mohammadi Y, Cheraghi Z & Gohari-Ensaf F. Risk factors for stomach cancer: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and Health* 2020; 42(1): e2020004.
3. Praud D, Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Rosso T, Galeone C, et al. Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. *European Journal of Cancer Prevention* 2018; 27(2): 124-33.
4. Minami Y, Kanemura S, Oikawa T, Suzuki S, Hasegawa Y, Miura K, et al. Associations of cigarette smoking and alcohol drinking with stomach cancer survival: A prospective patient cohort study in Japan. *International Journal of Cancer* 2018; 143(5): 1072-85.
5. Rahimkhani M, Mordadi A, Kazemian K & Khalili H. Comparison of helicobacter pylori detection methods: It's association with leukocytosis and monocytosis. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* 2020; 20(6): 920-4.
6. Bao P, Paterson DA, Harrison PL, Miller K, Peyman S, Jones JC, et al. Lipid coated liquid crystal droplets for the on-chip detection of antimicrobial peptides. *Lab on a Chip* 2019; 19(1): 1082-9.
7. Lee MW, Lee EY, Ferguson AL & Wong GC. Machine learning antimicrobial peptide sequences: Some surprising variations on the theme of amphiphilic assembly. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2018; 38(1): 204-13.
8. Gupta A, Landis RF, Li CH, Schnurr M, Das R, Lee YW, et al. Engineered polymer nanoparticles with unprecedented antimicrobial efficacy and therapeutic indices against multidrug-resistant bacteria and biofilms. *Journal of the American Chemical Society* 2018; 140(38): 12137-43.
9. Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, Fernandes L, Costa FF, Kioshima ES, et al. Antifungal drugs: New insights in research and development. *Pharmacology and Therapeutics* 2019; 195(1): 21-38.
10. Wessely-Szponder J, Zdziennicka J, Junkuszew A, Latalski M, Swieca M & Szponder T. Prospects and applications of natural blood-derived products in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 23(1): 472.
11. Boohaker RJ, Lee MW, Vishnubhotla P, Perez JM & Khaled AR. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. *Current Medicinal Chemistry* 2012; 19(22): 3794-804.
12. Xu P, Lv D, Wang X, Wang Y, Hou C, Gao K, et al. Inhibitory effects of Bombyx mori antimicrobial peptide cecropins on esophageal cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2020; 887(1): 173434.
13. Bevers EM, Comfurius P & Zwaal RF. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: Pathophysiological implications. *Lupus* 1996; 5(5): 480-7.
14. Lau JL & Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2018; 26(10): 2700-7.

15. Iwasaki T, Ishibashi J, Tanaka H, Sato M, Asaoka A, Taylor DM, et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. *Peptides* 2009; 30(4): 660-8.
16. Campbell AW. Inflammation and a solution: Probiotics. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2016; 22(5): 8-10.
17. Commane D, Hughes R, Shortt C & Rowland I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research* 2005; 591(1-2): 276-89.
18. Bonyadi F, Tukmechi A & Mohebalian H. An overview of probiotics and their role in cancer management. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2014; 24(112): 128-40[Article in Persian].
19. Khodaii Z, Mehrabani-Natanzi M, Khalighfard S, Ghandian-Zanjan M, Gharghi M, Khori V, et al. Novel targets in rectal cancer by considering lncRNA-miRNA-mRNA network in response to *Lactobacillus acidophilus* consumption: A randomized clinical trial. *Scientific Reports* 2022; 12(9168): 1-18.
20. Slizewska K, Markowiak-Kopec P & Slizewska W. The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers (Basel)* 2020; 13(1): 20.
21. Dasari S, Kathera C, Janardhan A, Kumar AP & Viswanath B. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. *Clinical Nutrition* 2017; 36(6): 1465-72.
22. Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, Kim WS, et al. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cellular Immunology* 2002; 219(1): 22-7.
23. Rahimkhani M, Mordadi A, Varmazyar S & Tavakoli A. Evaluation of urinary Interleukin-8 levels in patients with spinal cord injury. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2014; 9(2): 144-9.
24. Zhu X, Ying J, Wang F, Wang J & Yang H. Estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 status in invasive breast cancer: A 3,198 cases study at national cancer center, China. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014; 147(3): 551-5.
25. Ryan DP, Hong TS & Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(11): 1039-49.
26. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD & Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Research* 1991; 51(11): 3062-6.
27. Zhou X, Shi D, Zhong R, Ye Z, Ma C, Zhou M, et al. Bioevaluation of ranatuerin-2Pb from the frog skin secretion of *Rana pipiens* and its truncated analogues. *Biomolecules* 2019; 9(6): 249.
28. Gonzalez-Montoya M, Hernandez-Ledesma B, Silvan JM, Mora-Escobedo R & Martinez-Villaluenga C. Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry* 2018; 242(1): 75-82.
29. Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *European Urology* 2006; 50(1): 141-7.
30. Saido-Sakanaka H, Ishibashi J, Momotani E, Amano F & Yamakawa M. In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin. *Peptides* 2004; 25(1): 19-27.
31. Yang D, Zhu L, Lin X, Zhu J, Qian Y, Liu W, et al. Therapeutic effects of synthetic triblock amphiphilic short antimicrobial peptides on human lung adenocarcinoma. *Pharmaceutics* 2022; 14(5): 929.
32. Milajerdi A, Mousavi SM, Sadeghi AR, Salari-Moghaddam A, Parohan M, Larijani B, et al. The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: A meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition* 2020; 59(2): 633-49.

33. Kim S, Lee HH, Choi W, Kang CH, Kim GH & Cho H. Anti-tumor effect of heat-killed bifidobacterium bifidum on human gastric cancer through akt-p53-dependent mitochondrial apoptosis in xenograft models. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(17): 9788.

The Effect of D-Peptide-B and B.Bifidum Probiotic Lysate on the Expression of TNF- α and IL-1 Genes in AGS Cancer Cell Line Compared to Healthy HEK Cells

Shima Derakhshan¹ (M.S.), Negar Yavari Tehrani Fard¹ (M.S.), Nahid Aboutaleb² (Ph.D),
Maryam Naseroleslami^{3*} (Ph.D)

1 Master of Science in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Received: 23 Oct. 2022

Accepted: 9 May. 2023

Background and Aim: Today, natural compounds such as peptides and probiotics can be mentioned as a supplement to the treatment of diseases such as cancer. These compounds may be effective in preventing the progression or treatment of cancer by affecting some molecular pathways including inflammation. The aim of this study was to investigate the effect of D-peptide-B and B.bifidum probiotic lysate on the expression of TNF- α and IL-1 genes in gastric cancer cells of AGS cell line.

Materials and Methods: In this study, AGS and HEK cells were cultured in DMEM medium with 10% bovine serum. The cells were treated with different concentrations of D-peptide-B and B.bifidum lysate and were incubated for 24 hours. The cell viability was checked by MTT. For molecular investigations, after RNA extraction and cDNA synthesis, the relative expression of TNF- α and IL-1 genes was evaluated using Real time PCR, and the data were analyzed using statistical methods One-way ANOVA.

Results: The MTT results indicated that the AGS cancer cells' survival rate decreased after treatment with dipeptide-B and lysate of B.bifidum as compared to HEK control cells. Furthermore, the study found that the expression levels of TNF- α and IL-1 genes in gastric cancer cells were significantly higher after treatment with D-Peptide-B, bacterial lysate, or both, when compared to normal HEK cells ($P \leq 0.05$). Specifically, the IL-1 gene expression increased by 300% (4 times) for peptide treatment, 100% (2 times) for bacterial treatment, and 650% (7.5 times) for combined treatment. Similarly, the TNF- α gene expression increased by 350% for peptide treatment, 100% for bacterial treatment, and 520% for combined treatment. These results suggest that these compounds may have induced cell death in cancer cells by affecting other molecular pathways.

Conclusion: Considering that D-peptide-B and B.bifidum lysate had no significant toxicity on normal cells and caused a significant decrease in the survival of cancer cells and this toxicity was dose dependent, therefore, consideration might be given to these natural compounds in treatment of gastric cancer.

Keywords: Gastric Cancer, AGS, D-Peptide-B, B.bifidum Probiotic, Inflammation, IL-1, TNF- α

* Corresponding Author:
Naseroleslami M
Email:
m.naseroleslami@iautmu.ac.ir