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

محمد مهدی سلطان‌دلال،[۱و۲*] مجید مجرد،[۳] زهره صالحی‌پور،[۱] هدی عطاپور مشهد،[۴] رضا رئوفیان،[۳] زهرا رجبی[۱]

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴- گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱
E-mail: soltanirad34@yahoo.com

## 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، اگزماهای 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 اکثرا 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*.

## مقدمه

پروبیوتیک (Probiotic) واژه‌ای است که به میکروارگانیسم‌های 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 اولسراتیو، اسهال، اکتوپیک اگزما 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 میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش (تراکم ۱۰۱۱Cfu/gr در محتویات روده‌ای)، سرطان کولورکتال (CRC) یکی از گزینه‌های اصلی برای استفاده از



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

پروبیوتیک‌ها به نظر می‌رسد.[۸] سرطان کولورکتال، سومین سرطان شایع در میان انسان‌ها است. این سرطان به طور کلی جزو سرطان‌های خوش‌خیم محسوب می‌شود، به‌طوری که بیماران مبتلا به مراحل اولیه این سرطان دارای بقا پنج ساله به میزان ۶۳٪ می‌باشند. با این‌حال سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جمعیت‌های انسانی می‌باشد.[۶،۹] 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 به‌طوری‌که، بقا با تشخیص متاستاز در این بیماران تا ۱۰٪ کاهش می‌یابد.[۶] درمان‌های رایج کانسر کولورکتال عبارتند از جراحی، شیمی درمانی 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.[۱۰] 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 دیفیسیل* می‌شد.[۱۵] مطالعه‌ها بیش‌تر بر روی این دو سوش لاکتوباسیلوس نشان‌دهنده اثرات مثبت این پروبیوتیک‌ها در افزایش آپوپتوز سلول‌های توموری کولورکتال در 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 مایع‌رویی 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، به‌صورت لئوفیلیزه 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 ۱ml از کشت شبانه در ۵۰ml محیط کشت تازه MRS مجددا کشت داده شده و در دمای ۳۷ $^{\circ}$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 سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ RPM، باکتری‌ها رسوب داده شدند. محلول رویی با استفاده از فیلتر با منافذ ۰/۲۲µm استریل شد. در مرحله بعد این محلول با محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FBS 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 ۳ml 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 ۰/۲۲µm عبور داده شده و استریل گردید. این



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

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 Ampicillin, Mast) (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 مایع‌رویی، محیط باکتری‌ها و یا عصاره سلولی باکتری تیمار شدند. بعد از این مدت به هر چاهک مقدار ۱۰µl محلول MTT با غلظت 5mg/ml اضافه شده و سلول‌ها به مدت یک‌ساعت در انکوباتور ۳۷ °C انکوبه شدند. سپس محیط سلول‌ها تخلیه و سلول‌ها در ۱۰۰ µl 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 (به‌جزو 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 جزیی 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 سوبسترای 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.

اندازه‌گیری میزان آپوپتوز سلولی: به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر القای آپوپتوز در سلول CaCo-2، با استفاده از کیت رنگ سنجی فعالیت پروتیین کاسپاز سه ساخت (Sigma Co, Germany) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده میزان فعالیت پروتیین 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 1X 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 کاملا 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 پروتیینی نمونه تعیین و یکسان‌سازی گردید. مقدار ۵µl از محلول پروتیین 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



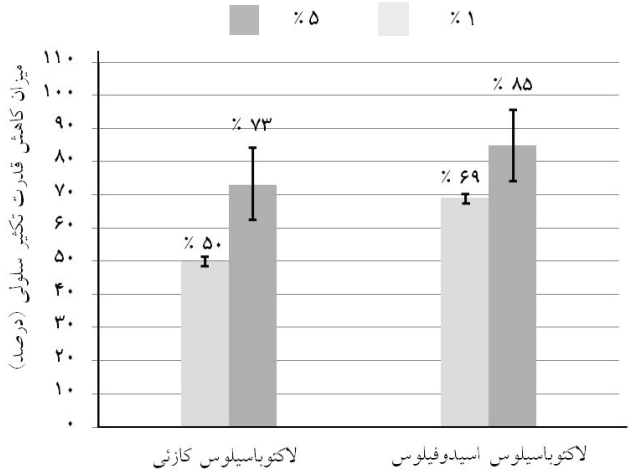
[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

این نمودار بر می‌آید، تیمار سلول‌ها با هر دو سوش لاکتوباسیل منجر به مهار تکثیر سلولی به‌صورت وابسته به دوز (Dose dependent) می‌شود. با این‌حال اثرات *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در تمام دوزها بیش از اثرات سوش کازئی می‌باشد. با توجه به این‌که 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 1X 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 این‌که تست Microculture Tetralzolium 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 این‌که FBS مورد استفاده در کشت سلولی 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 این‌حال 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 این‌که روند تغییر اثرات آپوپتوتیک

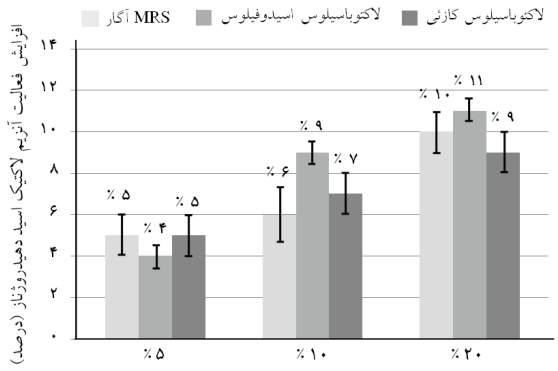
**نمودار- ۱: اثر مهاری مایع رویی محیط کشت باکتری بر رشد سلول رده سلولی Caco-2**. LA: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، LC: *لاکتوباسیلوس کازئی*. آزمایشات به‌صورت سه‌تایی انجام شد و انحراف‌معیار در نمودارها مشخص گردید.



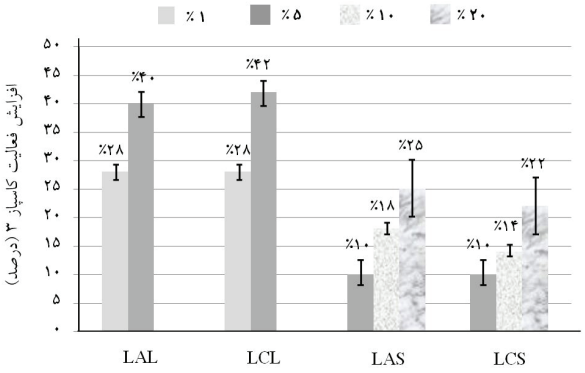

**نمودار- ۲: اثر مهاری عصاره باکتری لاکتوباسیلوس بر رشد سلول‌های CaCo-**. LA: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، LC: *لاکتوباسیلوس کازئی*. آزمایشات به‌صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف‌معیار در نمودارها مشخص گردید.



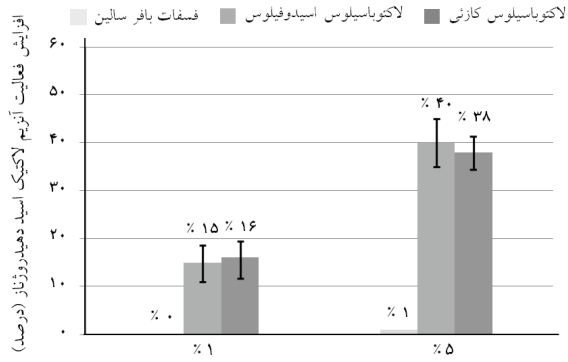
[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]




**نمودار- ۳: اثرات سوپ سلولی لاکتوباسیلوس بر القای نکروز سلولی.** LA: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، LC: *لاکتوباسیلوس کازئی*. آزمایشات به‌صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف‌معیار در نمودارها مشخص گردید.




**نمودار- ۵: اثرات سوپرناتانت لاکتوباسیلوس بر القای آپوپتوز سلولی.** LA: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، LC: *لاکتوباسیلوس کازئی*. آزمایشات به‌صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف‌معیار در نمودارها مشخص گردید.




**نمودار- ٤: اثرات عصاره باکتریایی لاکتوباسیلوس بر القای نکروز سلولی.** LA: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، LC: *لاکتوباسیلوس کازئی*. آزمایشات به‌صورت تریپلیکیت انجام شد و انحراف‌معیار در نمودارها مشخص گردید.

تیمار سلولی با روند تغییرات تکثیر سلولی مشابهت دارد، می‌توان نتیجه گرفت که حداقل بخشی از اثرات مهاری 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 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 هم‌چون آزوردوکتاز 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 لنفاوی مزانتریک نبوده و در واقع این عوامل می‌توانند الگوی پاسخ ایمنی کل بدن را تحت تاثیر قرار دهند.[۱۹و۲۵] علاوه بر این نقش پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر تسهیل درمان سرطان کولورکتال با 5-FU به خوبی شناخته شده است.[۱۶] با این‌حال



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

مطالعات انجام شده بر روی اثرات پروبیوتیک‌ها بر رفتار تکثیری سلول‌های مختلف نتایج متناقضی داشته است. به عنوان مثال در حالی‌که 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 پروتوانکوژن‌های 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 کولورکتال جلوگیری می‌کنند. نتایج به دست آمده در این بررسی می‌تواند نشان‌دهنده این مطلب باشد که لاکتوباسیل‌ها هم به طور مستقیم و با بر هم 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 به‌دست 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.

## 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. Ohigashi 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. Wenus 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'ecuyer A, Savoie M, Franco M, et al. Effect of a fermented milk combining Lactobacillus acidophilus Cl1285 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.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

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. Haghighi 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. Perdigón 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, Perdigón 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.

[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]

TUMJ Tehran University Medical Journal, July 2012; Vol. 70, No. 4: 220-227 Original Article

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

Mohammad Mehdi Soltan Dallal Ph.D.[1,2*]
Majid Mojarrad 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 lead 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.



[ Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-21 ]