مهار رشد رده سرطانی K562 لوسمی میلوییدی مزمن انسان با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی در شرایط آزمایشگاهی

فهیمه کبیری،[۱] وحید نجاتی،[۲] امیر توکمه‌چی،[۳*] نوروز دلیرژ،[۴] پویان نیک‌بخش[۵]

۱- گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی
۲- گروه بافت شناسی، زیست‌شناسی
دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی، پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- گروه ایمونولوژی، میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۵- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: آذربایجان غربی، ارومیه، خیابان شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی
تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۲۹۵
email: atokmachi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *لاکتوباسیلوس‌ها* از نظر ژنتیکی شامل گروه متنوعی از باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک هستند که به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند اثرات ضد توموری، کمک به تعادل فلور میکروبی روده، تولید ترکیبات ضد میکروبی، تحریک سیستم ایمنی میزبان و غیره تحت عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی بر رده سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوییدی خون انسان) می‌باشد. ***روش بررسی:*** برای این منظور محتویات روده ۱۱۵ قطعه ماهی کپور معمولی پس از صید از منابع آبی مختلف آذربایجان غربی از نظر وجود باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* بررسی شد. پس از جداسازی، شناسایی به کمک روش‌های معمولی و مولکولی باکتری شناسی انجام و عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی آن‌ها به طور جداگانه تهیه شد. برای مطالعه تاثیر عصاره‌ها بر سلول‌های سرطانی K562 از روش رنگ سنجی 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) استفاده شد. ***یافته‌ها:*** بر اساس یافته‌های این مطالعه عصاره‌های سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی قادر است به طور معنی‌داری رشد سلول‌های سرطانی را مهار سازد ($p<0/05$). در این ارتباط عصاره سیتوپلاسمی دو باکتری *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus casei* در غلظت موثره ۸۳/۳۳µg/ml به ترتیب با ۶۶/۵۶ و ۵۴/۲۸ درصد دارای بیشترین قدرت سلول‌کشی بودند ($p<0/05$). از طرف دیگر دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس‌های* فوق نتوانست رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند ($p<0/05$). ***نتیجه‌گیری:*** بر اساس یافته‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره سیتوپلاسمی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از روده کپور معمولی همانند *لاکتوباسیلوس‌های* با منشا انسانی دارای اثرات ضد توموری هستند.

کلمات کلیدی: رده سلول سرطانی K562، پروبیوتیک، مهار رشد، عصاره سیتوپلاسمی، دیواره سلولی.

مقدمه

در سال‌های اخیر نقش باکتری‌های اسید لاکتیک یا *لاکتوباسیلوس‌ها* (Lactobacillus) در حفظ و سلامتی انسان به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفته است. از نظر تعریف باکتری‌های مولد اسید لاکتیک عبارتند از اجرام گرم مثبت و غیر بیماری‌زایی که محصول نهایی تخمیر آن‌ها اسید لاکتیک می‌باشد.[۱] این باکتری‌ها قادرند با تاثیر بر سیستم ایمنی از ایجاد اسهال جلوگیری نمایند و یا آن را بهبود بخشند. این باکتری‌ها از طریق اتصال به جایگاه‌های هدف موجود در سلول‌های پوششی روده با عوامل بیماری‌زای ویروسی و باکتریایی رقابت کرده و مانع بروز عفونت می‌گردند.[۲-۴] همچنین این عوامل قادرند پاسخ‌های ایمنی ذاتی شامل ترشح سیتوکین‌ها از لنفوسیت‌ها را تحریک نمایند.[۵و۶] علاوه بر این *لاکتوباسیلوس‌ها* دارای فعالیت ضدسرطانی بوده و از متاستاز تومورها جلوگیری می‌کنند.[۷و۸] بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهد که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *Lactobacillus acidophillus*،[۶و۹] *Lactobacillus casei*،[۱۰] *Lactobacillus rhamnosus*[۶] و *Bifidobacterium longum*[۱۱-۱۳] قادرند رشد سلول‌های توموری القا شده (شیمیایی و پیوندی) را در جوندگان مهار نمایند. همچنین یافته‌های به‌دست آمده از مطالعات محققان نشان می‌دهد که اجزای سلولی *لاکتوباسیلوس‌ها* شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

حرارت، دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان و عصاره سیتوپلاسمی دارای عملکردهای متفاوتی به هنگام مجاور شدن با سلول‌های سرطانی هستند.[۱۴] سرطان خون یا لوسمی (Leukemia) بیماری پیش‌رونده و بدخیم بافت‌های خون‌ساز بدن است. این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و پیش‌سازهای آن‌ها در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود. واژه لوسمی به معنی خون سفید بوده و یکی از چهار سرطان شایع در میان کودکان محسوب می‌شود. در بیماری لوسمی تولید طبیعی گویچه‌های سفید خون متوقف شده و توانایی فرد در مقابله با بیماری‌ها از بین می‌رود. همچنین سلول‌های لوسمی تولید سایر سلول‌های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می‌شوند (از جمله گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها) را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بر اساس نوع گویچه سفید خون که دچار تراریختگی و سرطان می‌شود لوسمی به دو دسته تقسیم می‌شود: الف) لنفوییدی یا لنفوبلاستی: این نوع لوسمی سلول‌های لنفاوی یا لنفوسیت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این بافت جزء اصلی سیستم ایمنی بدن است و در قسمت‌های مختلف بدن از جمله عقده‌های لنفاوی، طحال و لوزه‌ها یافت می‌شود. ب) میلوییدی یا مغز استخوانی: این نوع لوسمی سلول‌های مغز استخوان را درگیر می‌کند. همچنین هر دو لوسمی به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند، بر این اساس چهار نوع لوسمی وجود دارد: (ALL، CLL، AML، CML).[۱۵] سلول‌های سرطانی K562 (CML) جزء سلول‌های سرطانی خون با منشا میلوییدی هستند که برای اولین بار از یک پیر زن ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جداسازی شده است. مطالعات بالینی انجام شده نشان می‌دهد که استفاده از پروبیوتیک‌ها در خلال وعده‌های غذایی، قادر است کیفیت زندگی کودکان مبتلا به لوسمی را بهبود دهد.[۱۶] در حال حاضر بیشتر گزارش‌های موجود حاکی از فعالیت ضد توموری و تحریک سیستم ایمنی اجزای سلولی *لاکتوباسیلوس*‌هایی است که دارای منشا انسانی هستند. با این وصف بررسی‌های انجام شده و مرور منابع علمی موجود نشان می‌دهد که تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در زمینه تاثیر *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از آبزیان از جمله ماهی کپور معمولی و عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی آن‌ها بر سلول‌های توموری انسان انجام نشده است. هدف از انجام این تحقیق، مطالعه تاثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی در مقایسه با یک پروبیوتیک انسانی (Lactobacillus rhamnosus) بر سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوییدی خون) با روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (In vitro) در پژوهشکده‌های زیست فن‌آوری و آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه در زمستان ۱۳۸۸ و بهار و تابستان ۱۳۸۹ طی مراحل زیر انجام گرفت.

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس‌ها*: به منظور جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس‌ها* تعداد ۱۱۵ قطعه ماهی کپور معمولی بالغ به صورت تصادفی از منابع آبی موجود در آذربایجان غربی (تابستان و پاییز ۱۳۸۷) صید و به کمک ظروف پلاستیکی به حجم ۱۰۰ لیتر و یک عدد کپسول اکسیژن با وسایل جانبی در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. ابتدا ماهیان بی‌هوش شده و سپس در شرایط استریل دیواره شکم آن‌ها برش داده شده و کل محتویات روده تخلیه و هموژن گردید. در مرحله بعد کشت محتویات روده بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) آگار (Merck, Germany) در شرایط بی‌هوازی و به کمک سیستم گاز پک (BBL) در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸–۲۴ ساعت صورت گرفت. پس از رشد، کلنی‌های ظاهر شده به ۱۰ml محیط آبگوشت MRS (Merck, Germany) استریل منتقل شدند. سپس باکتری‌های جدا شده میله‌ای شکل گرم مثبت و کاتالاز منفی جهت تشخیص افتراقی بر اساس روش‌های استاندارد میکروبیولوژی (شامل مورفولوژی، آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR) انتخاب شدند. برای شناسایی از تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، احیاء نیترات، تولید گاز از گلوکز، حرکت، Voges-Proskauer (VP) و تخمیر کربوهیدرات‌ها استفاده شد. سرانجام سویه‌های شناسایی شده در محیط آبگوشت MRS حاوی ۴۰٪ گلیسیرین و در سرمای ۸۰– °C تا زمان استفاده ذخیره شدند.

کشت باکتری‌ها و تهیه عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی آن‌ها: پس از تایید تشخیص باکتری‌ها، هر کدام از آن‌ها به صورت جداگانه در 5ml محیط کشت آبگوشت MRS به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ °C کشت داده شدند. پس از رشد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

(بر اساس ایجاد کدورت محیط کشت) باکتری‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر با ۶/۹ شستشو داده شدند. سپس رسوب حاصل در ۱ml از همان بافر سوسپانسیون شده و به مدت یک شبانه روز در سرمای $-80^{\circ}C$ نگهداری شد. در نهایت به منظور به‌دست آوردن عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی هر کدام از باکتری‌ها طبق روش Lebendiker[17] عمل شد. به طور خلاصه، ابتدا ۱۰۰µl بافر لیز کننده به ۱ml سوسپانسیون باکتری‌ها پس از خروج از حالت انجماد اضافه شد. در مرحله بعد عمل خرد کردن سلول‌های باکتری در حضور بافر لیز کننده به کمک دستگاه سونیکاتور (Soniprep 150, UK) و در کنار یخ انجام گرفت. سرانجام نمونه‌ها با دور ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شده و محلول رویی (به عنوان عصاره سیتوپلاسمی) از رسوب حاصل (به عنوان دیواره سلولی) جدا شده و به کمک دستگاه انجماد خشک (Freeze drier) به صورت کریستال درآمدند. همچنین به رسوب حاصله نیز به منظور انحلال پروتیین‌های نامحلول ۱۰۰µl بافر لیز کننده اضافه گردید.

نحوه تهیه بافر لیز کننده: ابتدا محلولی شامل ۱۴۰ میلی‌مول NaCl، ۲/۷ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول Na2HPO4، ۱/۸ میلی‌مول KH2PO4 با pH برابر با ۷/۳ تهیه شد. سپس محلول فوق به کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. جهت تهیه بافر لیز کننده به صورت روزانه ۱۰ درصد گلیسرین، ۰/۲mmol لیزوزیم، ۱۰ میلی‌مول ۲- مرکاپتو اتانول و ۲-۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰ به محلول فوق اضافه شد.[17]

تعیین غلظت‌های مختلف از عصاره‌های سیتوپلاسمی: در این تحقیق ابتدا غلظت پروتیین‌های موجود در هر کدام از عصاره‌های سیتوپلاسمی و دیواره سلولی با روش برادفورد[18] اندازه‌گیری شد. سپس به کمک محیط کشت یاخته Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Gibco, England) عمل رقیق‌سازی انجام شد. عصاره سیتوپلاسمی در رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و از دیواره سلولی نیز رقت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون همه رقت‌ها به طور جداگانه استریل و تا زمان استفاده در سرمای $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند.

تهیه سلول‌های سرطانی و کشت آن‌ها: سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوییدی خون انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (گیبکو، انگلستان) در حضور ۱۰ درصد FBS یا سرم جنین گاوی (گیبکو، انگلستان)، ۱۰۰IU/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور با ۵٪ CO2 و دمای $37^{\circ}C$ کشت داده شدند.

سنجش خاصیت ضد توموری عصاره‌ها با آزمون MTT: در این بررسی از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازیی*، *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* به عنوان پروبیوتیک‌های جدا شده از ماهی و از باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به عنوان پروبیوتیک با منشا انسانی جهت بررسی خواص ضد توموری بر اساس روش Chang و همکاران[11] و Li-Rui و همکاران[19] استفاده شد. به طور خلاصه، پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول‌ها مقدار ۱۰۰µl (با تراکم ۱۰۰۰۰سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵٪ FBS) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۵۰µl محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره‌های سیتوپلاسمی و دیواره‌های سلولی به چاهک‌ها اضافه گردید. که در نهایت غلظت موثره عصاره‌های سیتوپلاسمی و دیواره‌های سلولی به ۱/۳ میزان اولیه تقلیل یافت. سه چاهک دیگر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰µl سلول به همراه ۴۵µl محیط کشت و ۵µl بافر لیز کننده افزوده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ و در حضور ۵٪ گاز CO2 گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰µl از محلول MTT (۳-۴ و ۵ دی‌متیل تیازول ۲-۵ دی‌فنیل تترازولیوم بروماید، 5mg/ml بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و پلیت به مدت چهار ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده برم محلول MTT را احیا کرده و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان در می‌آورد. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰µl محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در انکوباتور Shaker دار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده Optical Density (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. درصد سلول کشی عصاره‌ها با این فرمول محاسبه شد:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

$$\text{درصد سلول‌کشی} = \frac{\text{OD کنترل} - \text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times ۱۰۰$$

بر اساس این فرمول IC50 (غلظتی که در آن موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰٪ می‌گردد) عصاره‌های سیتوپلاسمی محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way Analysis of Variance (ANOVA، نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ و آزمون Tukey's (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ بود، همچنین ترسیم نمودارها در نرم‌افزار Excel (۲۰۰۷) انجام گرفت.

یافته‌ها

از مجموع ۱۱۵ نمونه محتویات روده ماهی کپور صید شده از منابع آبی آذربایجان غربی تعداد ۲۶ نمونه مخمر، ۱۰ جدایه باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت و کاتالاز منفی روی محیط MRS آگار رشد کردند. تعداد چهار جدایه از باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی به ترتیب: *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتارم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس ساکائی* بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندهای مختلف تشخیص داده شدند (جدول ۱).

فعالیت سلول‌کشی عصاره‌های سیتوپلاسمی: یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره‌های سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از کپور در مقایسه با گروه شاهد که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند دارای فعالیت سلول‌کشی هستند. بر اساس این نتایج می‌توان گفت که فعالیت سلول‌کشی کاملا وابسته به دوز می‌باشد یعنی با افزایش غلظت عصاره‌های سیتوپلاسمی درصد مرگ سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد (نمودار ۱).

جدول- ۱: نتایج تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات‌های *لاکتوباسیلوس*‌های جدا شده از روده ماهی کپور.

تست	*L. sakei*	*L. paracasei*	*L. casei*	*L. plantarum*
رشد در ۱۵ °C	+	+	+	+
رشد در ۴۵ °C	-	-	+	-
VP	-	-	-	-
احیاء نیترات	-	-	-	-
تولید گاز از گلوکز	+	-	+	-
حرکت	-	-	-	-
کاتالاز	-	-	-	-
آرابینوز	-	-	-	+
اینوزیتول	-	-	-	+
اینولین	-	-	-	-
رافینوز	-	-	-	+
رامنوز	-	-	-	-
سلوبیوز	+	+	+	+
سوربوز	-	-	-	-
سوربیتول	-	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+
گزیلوز	-	-	-	-
لاکتوز	-	+	+	+
مانوز	+	+	+	+
مانیتول	-	+	+	+
ملزیتوز	-	+	+	+
ملیبیوز	-	-	-	+

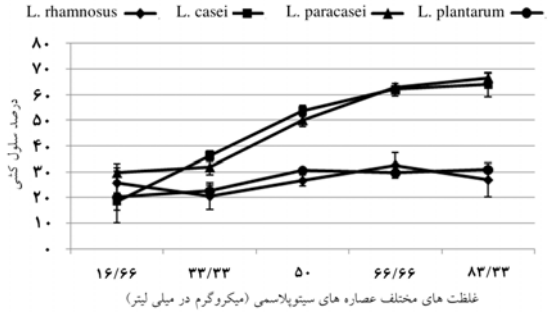
+: مثبت، -: منفی، VP: Voges-Proskauer

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

جدول- ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف دیواره سلولی بر افزایش رشد سلول‌های سرطانی K562.

باکتری	غلظت‌های موثره دیواره سلولی (µg/ml)				
لاکتوباسیلوس کازیی	۳۱/۴۲±۳/۲[a]	۴۹/۲۸±۱/۹[a]	۴۵/±۵/۱۷[a]	۲۲/۸۲±۰/۳[a]	۲۰/۹۴±۲/۰۶[a]
لاکتوباسیلوس پاراکازیی	۱۸/۰۸±۱/۱۲[b]	۲۰/۱۷±۱/۱[b]	۱۹/۵۱±۱/۷[b]	۶/۹۴±۸/۱۲[b]	۱۹/۹۵±۹/۱[a]
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۶/۹۴±۱/۳۲[c]	۲۶/۹۰±۵/۰۲[b]	۲۵/۶۸±۵/۵۲[b]	۰/۸۸±۲/۵*[c]	۲/۹۷±۳/۱*[b]
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۱۴±۳/۶[b]	۱۹/۰۷±۴/۲۱[b]	۴/۷۴±۴/۴[b]	۱/۱±۱/۵*[c]	۲/۰۹±۱/۷۲*[b]

داده‌ها به صورت Mean ± SD بیان شده‌اند (n=۳ و p<۰/۰۵). * غلظت‌های مذکور موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی شده‌اند، سایر غلظت‌ها رشد سلول‌های سرطانی را افزایش دادند.



نمودار- ۱: تاثیر غلظت‌های موثره مختلف عصاره‌های سیتوپلاسمی بر رشد سلول‌های سرطانی K562.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که به ترتیب عصاره‌های سیتوپلاسمی *Lactobacillus paracasei*، *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* دارای بیشترین تاثیر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی K562 می‌باشند. عصاره‌های *Lactobacillus paracasei* با غلظت موثره ۵۰µl/ml و *Lactobacillus casei* با غلظت موثره ۶۶/۶µl/ml توانستند ۵۰٪ سلول‌های سرطانی را از بین ببرند. علاوه بر این عصاره سیتوپلاسمی *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* توانستند به طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند اما در هیچ یک از غلظت‌های به کار رفته نتوانستند ۵۰٪ سلول‌های سرطانی را از بین ببرند. فعالیت سلول کشی دیواره سلولی: یافته‌های حاصل نشان داد که دیواره سلولی باکتری‌های *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus casei* نه تنها نتوانست رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند (جدول ۱)، بلکه رشد آن سلول‌ها را نسبت به گروه شاهد که هیچ غلظتی دریافت نکرده بودند افزایش داد. از طرف دیگر دیواره سلولی *Lactobacillus rhamnosus* با غلظت موثره ۱۶۶/۶ و ۳۳۳/۳µl/ml و *Lactobacillus plantarum* با غلظت موثره ۱۶۶/۶µl/ml به میزان ناچیزی توانستند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند، اما این مهار معنی‌دار نبود (p<۰/۰۵).

بحث

تحقیقات صورت گرفته ثابت می‌کند که برخی از باکتری‌های *لاکتوباسیل*‌ها می‌توانند رشد سلول‌های توموری را در شرایط In–Vitro و In–Vivo مهار سازند.[۲۰] یافته‌های به‌دست آمده توسط محققین نشان می‌دهد که دیواره سلولی خالص شده باکتری *Bifidobacterium infantis* مسئول فعالیت ضد سرطانی است.[۲۱] همچنین Fichera و Giese در سال ۱۹۹۴[۲۲] گزارش کردند که *Lactobacillus casei* و پپتیدوگلیکان جدا شده از دیواره سلولی آن قادر است رشد سلول‌های سرطانی انسان و موش را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که عصاره سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان باکتری‌های اسید لاکتیک همانند سلول کامل کشته شده (توسط حرارت) فعالیت ضد تکثیری علیه سلول‌های سرطانی را از خود بروز می‌دهند.[۲۳] این محققان تاثیر اجزای سلولی ۱۰ پروبیوتیک را با غلظت ۱۰۰µl/ml بر ضد ۱۱ رده سلول سرطانی از جمله K562 بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که علی‌رغم تاثیر ضد تکثیری پپتیدوگلیکان باکتری‌های اسید لاکتیک علیه اکثر سلول‌های سرطانی مطالعه شده در تحقیق تاثیری بر سلول‌های سرطانی K562 نداشتند. بر این اساس اظهار داشتند که پپتیدوگلیکان یکی از اجزای مهم و موثر در خاصیت ضد سرطانی *Lactobacillus casei* می‌باشد. این محققین دریافتند که عصاره‌های سیتوپلاسمی مطالعه شده می‌توانند به طور تقریبی رشد تمام سلول‌های سرطانی را با درصدهای مختلف مهار نمایند و حتی در بعضی موارد تاثیر آن‌ها قوی‌تر از پپتیدوگلیکان است. از طرف دیگر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

نشان دادند که رشد سلول‌های K562 که به ندرت توسط سلول کامل باکتری‌ها مهار می‌شود توسط عصاره سیتوپلاسمی مهار گردید. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط Lee[۱۴] صورت گرفت معلوم شد که عصاره سیتوپلاسمی *Lactobacillus casei* و *Bifidobacterium* تاثیر مستقیم بر مهار رشد رده سلول‌های سرطانی دارد به این ترتیب که در غلظت ۵۰µl/ml موجب مهار رشد تقریبا ۵۰٪ سلول‌های سرطانی گردیدند. در تحقیق حاضر تاثیر عصاره‌های سیتوپلاسمی و دیواره‌های سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از روده ماهی کپور معمولی شامل: *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus paracasei*، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* (پروبیوتیک با منشا انسانی) بر رشد رده سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوییدی خون انسان) بررسی شد. عصاره‌های سیتوپلاسمی هر چهار باکتری توانستند رشد سلول‌های سرطانی را مهار سازند، طوری‌که با افزایش غلظت قدرت سلول کشی آن‌ها افزایش یافت. *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus casei* در غلظت موثره ۸۳/۳۳µl/ml به ترتیب ۶۶/۵۷ و ۵۴/۲۸ درصد سلول‌های سرطانی را کشتند. IC50 غلظتی که در آن موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰٪ می‌گردد. *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus casei* به ترتیب غلظت‌های ۵۰ و ۶۶/۶۶µl/ml بودند. *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* در هیچ یک از غلظت‌های به‌کار رفته نتوانستند ۵۰٪ سلول‌های سرطانی را از بین ببرند. هنوز مکانیزم دقیق عملکرد ضد سرطانی عصاره سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس‌ها* مشخص نیست اما گفته شده که یکی از پپتیدهای موجود در عصاره سیتوپلاسمی آن‌ها لاکتوفرین است. این ماده در انتهای N خود دارای توالی خاصی از اسیدهای آمینه است که خاصیت ضد توموری دارند و موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های سرطانی می‌شوند.[۲۴] به تازگی Mader[۲۵] نشان داد که لاکتوفرین توانایی مهار رگ زایی (Angiogenesis) که مرحله‌ای ضروری برای رشد تومور محسوب می‌شود را دارد. یافته‌های حاصل از تاثیر دیواره سلولی باکتری‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی کپور بر مهار رشد سلول سرطانی K562 نشان داد که هیچ‌کدام از دیواره‌های سلولی باکتری‌ها نتوانستند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کنند. لازم به ذکر است که دیواره سلولی *Lactobacillus plantarum* با غلظت موثره ۱۶۶/۶µl/ml توانست به میزان کمتر از ۱٪، سلول‌های سرطانی را بکشد. همچنین دیواره سلولی *Lactobacillus rhamnosus* با منشا انسانی توانست با غلظت‌های موثره ۱۶۶/۶ و ۳۳۳/۳µl/ml به ترتیب ۱/۱۰ و ۲/۰۹ درصد سلول‌های سرطانی را بکشد. نکته جالب این بود که دیواره‌های سلولی باکتری‌های جدا شده از کپور نه تنها رشد سلول‌های سرطانی را مهار نکردند بلکه موجب تقویت رشد آن‌ها نیز گردیدند که بیشترین مقادیر متعلق به دیواره سلولی *Lactobacillus casei* به میزان ۴۹/۲۸٪ و *Lactobacillus paracasei* به میزان ۲۰/۱۷ درصد در غلظت موثره ۴۱/۶۶µl/ml بود. در ضمن تقویت رشد سلول‌های سرطانی توسط دیواره‌ها از الگوی خاصی تبعیت نکرده و معنی‌دار ($p<0/05$) نبود. همان‌طور که اشاره گردید طبق تحقیقات انجام گرفته دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان *لاکتوباسیلوس‌ها* دارای خاصیت ضد سرطانی است، اما نتایج تحقیق حاضر مخالف تحقیقات صورت گرفته می‌باشد. دلیل این امر می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که در تحقیقات صورت گرفته دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان توسط اتوکلاو استریل گردیده ولی در مطالعه حاضر رسوب باقی مانده به عنوان دیواره سلولی پس از تهیه رقت‌های لازم با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲. میکرون استریل گردید بنابراین پپتیدو گلیکان که جز ضد سرطانی و ضد جهشی دیواره سلولی است به صورت کامل از فیلتر عبور نمی‌نماید.[۲۳]

بر اساس مرور منابع علمی چنین استنباط می‌شود که پرین‌های موجود در دیواره سلولی دارای خاصیت میتوژنی بوده که به هنگام فیلتراسیون رقت‌های دیواره سلولی عبور کرده و تقسیم میتوزی سلول‌های سرطانی و رشد آن‌ها را افزایش می‌دهند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های سیتوپلاسمی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از روده ماهی کپور معمولی مانند سایر باکتری‌های اسید لاکتیک با منشا انسانی و حیوانی دارای خاصیت ضد توموری بوده و حتی در مواردی بهتر از آن‌ها عمل می‌نمایند. با این وجود در مورد استفاده از این فرآورده‌های بیولوژیک انجام تحقیقاتی میدانی بیشتر احساس می‌گردد.

سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی و دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

References

1. Kirjavainen PV, ElNezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. Effects of orally administered viable Lactobacillus rhamnosus GG and Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(6):799-802.
2. Baricault L, Denariaz G, Houri J, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 1995;16(2):245-252.
3. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):403S-409S.
4. Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 2000;71(4):861-72.
5. Gill HS, Rutherfurd KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). *Br J Nutr* 2000;83(2):167-76.
6. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):451S-455S.
7. Hashimoto S, Nomoto K, Nagaoka M, Yokokura T. In vitro and in vivo release of cytostatic factors from Lactobacillus casei-elicited peritoneal macrophages after stimulation with tumor cells and immunostimulants. *Cancer Immunol Immunother* 1987;24(1):1-7.
8. Koyanagi K, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Clinical significance of telomerase activity in peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002;73(3):927-32.
9. McIntosh GH, Royle PJ, Playne MJ. A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer* 1999;35(2):153-9.
10. Tomita K, Akaza H, Nomoto K, Yokokura T, Matsushima H, Homma Y, et al. Influence of Lactobacillus casei on rat bladder carcinogenesis. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1994;85(4):655-63.
11. Chang KH, Park JS, Choi JH, Kim CJ, Paik HD. Cytotoxic effects of partially purified substances from Bacillus polyfermenticus SCD supernatant toward a Varity of tumor cell lines. *Food Sci Biotechnol* 2007;16:163-6.
12. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res* 1993;53(17):3914-8.
13. Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18(4):833-41.
14. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. *J Vet Sci* 2004;5(1):41-8.
15. Mahmoud Abadi A. Leukemia (Blood cancer). Mashhad: Kerdegari Publisher; 2008. p. 11-55. [Persian]
16. Ekert H, Jurk IH, Waters KD, Tiedemann K. Prophylactic co-trimoxazole and lactobacilli preparation in neutropenic patients. *Med Pediatr Oncol* 1980;8(1):47-51.
17. Lebendiker M. The Wolfson Centre for Applied Structural Biology. Bacterial Protein Extraction (mini-scale) Sonication. 2002. Available from: URL:http://wolfson.huji.ac.il/purification/TagProteinPurif/Lysis_Bacterial_Cells.html
18. Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The Protein Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 1996. p. 11-5.
19. Sun LR, Li X, Cheng YN, Yuan HY, Chen MH, Tang W, et al. Reversal effect of substituted 1,3-dimethyl-1H-quinoxalin-2-ones on multidrug resistance in adriamycin-resistant K562/A02 cells. *Biomed Pharmacother* 2009;63(3):202-8.
20. Salminen S, Deighto MA, Benno Y, Gorbach SL. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S, Wright VA, editors. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker, Inc; 1998. p. 211-53.
21. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium lactis, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 2005;40(1):28-37.
22. Fichera GA, Giese G. Non-immunologically-mediated cytotoxicity of Lactobacillus casei and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett* 1994;85(1):93-103.
23. Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Kim KH, Lee HJ. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of Lactococcus lactis ssp lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. *Nutr Cancer* 2003;46(2):197-201.
24. Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y, Tamai Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *J Dairy Sci* 2002;85(9):2065-74.
25. Mader JS, Smyth D, Marshall J, Hoskin DW. Bovine lactoferricin inhibits basic fibroblast growth factor- and vascular endothelial growth factor165-induced angiogenesis by competing for heparin-like binding sites on endothelial cells. *Am J Pathol* 2006;169(5):1753-66.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 12, Mar 2011: 691-698

Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of *Lactobacilli* isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study

Fahimeh Kabiri MSc.[1]
Vahid Nejati PhD.[2]
Amir Tukmechi PhD.[3*]
Nowroz Delirezh PhD.[4]
Pouyan Nikbakhsh BSc.[5]

1- Department of Biology (Histology and Embryology), Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Histology, Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Department of Microbiology, Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Department of Immunology, Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
5- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran.

*Corresponding author: Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Shahid Beheshti Ave., Urmia, West Azarbaijan, Iran.
Tel: +98- 441- 3440295
email: atokmachi@gmail.com

Received: December 25, 2010 Accepted: January 09, 2011

Abstract

***Background*:** *Lactobacillus species* are genetically diverse groups of Lactic Acid Bacteria (LAB) that have been introduced as probiotics, because of some characteristics such as their anti-tumor properties, helping the intestinal flora balance, production of antibiotics, stimulation of host immune response, etc. The aim of this study was to investigate the effects of cytoplasmic extraction and cell wall of Lactobacillus species isolated from the intestine of common carp on human chronic myelocytic leukemia or K562 cancer cell lines.

***Methods*:** The intestinal contents of 115 common carp captured from the natural resources of West Azerbaijan province in Iran were examined for LAB. After isolation, the identification of Lactobacilli was done according to traditional and molecular bacteriological tests. Subsequently, a suspension of each bacterium was prepared and the protein content of the cytoplasm was extracted. Cell wall disintegration was done by cell lysis buffer and sonication. The effects of cytoplasmic extraction and cell wall on K562 cell line proliferation were investigated by MTT assays.

***Results*:** The cytoplasmic extraction of the isolated Lactobacilli had significant ($p<0.05$) anti-proliferative effects on K562 cells. The cytoplasmic extractions of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei* inhibited K562 cell proliferation by 66.56% and 54.28% at 83.33 µg/ml concentration, respectively. Nevertheless, the Lactobacillus cell wall could not inhibit the proliferations of K562 cells ($p<0.05$).

Conclusion: In this study, the cytoplasmic extractions of the isolated Lactobacilli from the intestine of common carp had anti-proliferative effects on K562 cell line.

Keywords: Cell line, chronic myelocytic leukemia, lactobacillus, K562, MTT assay probiotic, extraction.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-20]