

## بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643 و لاکتوباسیلوس کازیبی PTCC 1608 بر روی بیان ژن‌های TLR2 و TLR4 در سلول‌های HT29 عفونی شده با سالمونلا انتریتیدیس

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۲ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

**زمینه و هدف:** گونه‌های لاکتوباسیلوس به دلیل داشتن توانایی تعدیل پاسخ‌های ایمنی در انسان و اثرات درمانی در اختلالات التهابی، به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات استرین‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بر روی بیان ژن‌های TLR2، TLR4 در رده‌ی سلول‌های سرطان کولون (HT-29) عفونی شده با سالمونلا انتریتیدیس بود.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی از فروردین تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در این مطالعه از دو سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643 و لاکتوباسیلوس کازیبی PTCC 1608 استفاده شد. سلول‌های HT29 کشت داده شدند و سپس این سلول‌ها پیش و پس از چالش با پاتوژن، توسط سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس تیمار شدند. پس از استخراج RNA تام از سلول‌ها و سنتز cDNA، توانایی لاکتوباسیلوس‌ها در تعدیل بیان ژن‌های TLR-2 و TLR-4 توسط روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** یافته‌های ما نشان داد که پس از تیمار سلول‌های سالم و غیرعفونی HT29، با هر یک از دو باکتری پروبیوتیک، بیان ژن‌های TLR2-4 به‌طور چشمگیری افزایش داشت. برخلاف آن، میزان بیان این دو ژن در سلول‌های آلوده به سالمونلا انتریتیدیس، پیش و پس از درمان با هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازیبی به‌صورت معناداری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی دارای اثر چشمگیر ضدالتهابی در برابر بیماری‌زایی باکتری سالمونلا انتریتیدیس هستند. اما در این مطالعه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس فعالیت ضد التهابی قوی‌تری را نسبت به لاکتوباسیلوس کازیبی از خود نشان داد.

**کلمات کلیدی:** لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازیبی، پروبیوتیک، سالمونلا انتریتیدیس، گیرنده‌های شبه Toll.

محمد مهدی سلطان‌دلال<sup>۱\*</sup>

منا مشیری<sup>۱</sup>، عباس میرشفیعی<sup>۳</sup>

معصومه دورقی<sup>۱</sup>، فرهاد رضایی<sup>۴</sup>

مهرداد غلامی<sup>۵</sup>

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵- گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی،

دانشگاه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

مازندران، ساری، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس،  
خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده  
بهداشت، گروه پاتوبیولوژی.

تلفن: ۸۸۹۹۲۹۶۷۱-۰۲۱

E-mail: msoltandallal@gmail.com

### مقدمه

رقابتی روده‌ای در مقابل پاتوژن‌ها، کمک به تعادل فلور میکروبی روده، خنثی‌سازی کارسینوژن‌های مربوط به رژیم غذایی، فعالیت ضد سرطان کولون، نقش در اختلالات تنفسی و علائم آلرژیک، خاصیت ضد التهابی، افزایش وظایف دفاعی، مدولاسیون و هدایت سیگنال‌های سلول‌های اپی‌تلیال و تعدیل پاسخ ایمنی ذاتی و تطبیقی اشاره کرد.<sup>۱</sup> این میکروارگانیسم‌های زنده که به‌عنوان پروبیوتیک مصرف می‌شوند،

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی متشکل از میکروارگانیسم‌های همسفره زنده هستند که پس از هضم، سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشد و مزایای زیادی برای میزبان به‌همراه دارد. از جمله‌ی این مزایا می‌توان به تولید متابولیت‌های متعدد ضد میکروبی، ممانعت

عفونت سالمونلا /انتریتیدیس شامل سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضد التهابی و کموکین‌های زیادی می‌باشد که در دفاع بدن در برابر این پاتوژن نقش بسزایی دارند.<sup>۱۷،۱۶</sup>

هدف از انجام پژوهش کنونی، بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس کازی PTCC 1608 بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) در چالش با سالمونلا /انتریتیدیس و آنالیز بیان ژن‌های TLR2,4 در شرایط آزمایشگاهی بود.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران انجام شد. در این مطالعه از دو پروبیوتیک با منشأ بومی (لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس PTCC1643 و لاکتوباسیلوس کازی PTCC 1608) (مرکز کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر زیستی ایران) استفاده شد. هر دو این سویه‌ها برای بهبود رشد و غنی‌سازی، روی محیط براث (MRS) de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت و با وجود مکمل ۰/۰۵٪ سیستین و در گرمخانه °C ۳۷، گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن با استفاده از Phosphate-buffered saline (PBS) مقدار ۱۰<sup>۷</sup> CFU سوسپانسیون از باکتری‌ها تهیه شد. همچنین سویه پاتوژن مورد استفاده در این مطالعه سالمونلا /انتریتیدیس سرووار انتریتیدیس بود که پس از انجام کشت سویه یادشده در محیط‌های گزیلوز-لیزین-حزوکسی کولات آگار (XLD) و هکتون انتریک آگار (HE) و انجام تست‌های افتراقی این سویه روی محیط‌های افتراقی KIA agar، سیمون سترات، اوره، MR-VP و SIM دوباره تایید هویت شد. سپس یک کلنی تک، از ایزوله‌ی سالمونلا /انتریتیدیس که در محیط LB agar کشت داده شده بود، در ۵ ml محیط LB براث در شرایط هوایی برده شد و پس از آن به مدت ۱۶ ساعت همراه با Shaking در دمای °C ۳۷ انکوبه شد تا پیش از استفاده، غنی‌سازی و رسیدن به فاز لگاریتمی در این باکتری صورت گیرد.

رده‌ی سلول‌های سرطانی کولون (HT29) از بانک سلولی (Institute of Pasture, Tehran, Iran) خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین در دمای °C ۳۷ و رطوبت ۵٪ به مدت ۲۰

کارایی درمانی زیادی برای انسان به‌همراه دارند، به‌طوری‌که در درمان اسهال ناشی از باکتری‌های پاتوژن روده‌ای مانند سالمونلا، کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک، بیماری عدم تحمل لاکتوز، سندرم روده‌ی تحریک‌پذیر و سرطان‌های کولون نقش دارند.<sup>۳،۴</sup> نقش پروبیوتیک‌ها در تعدیل پاسخ ایمنی می‌تواند به‌علت تاثیر این میکروارگانیسم‌های مفید زنده روی ترشح بعضی سایتوکین‌ها و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ذاتی باشد.<sup>۶،۹</sup> نوع اثر پروبیوتیک، به تولید متابولیت‌های فعال از نظر بیوشیمیایی آن‌ها یا مولکول‌های موجود بر سطح این میکروارگانیسم‌ها یا اجزای مترشحه از آن‌ها بستگی دارد. بنابراین اثرات پروبیوتیک‌ها را به محصولات حاصل از تخمیر میکروارگانیسم‌ها مانند پپتیدها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده در طی تخمیر آن‌ها و ترکیبات دیواره‌ی سلولی و پپتیدوگلیکان و هر بخشی از باکتری حتی DNA نسبت می‌دهند.<sup>۷-۹</sup>

TLRها یک نوع از ۱۰ نوع پروتئین‌های ترانس ممبران انسانی هستند که به‌عنوان گیرنده‌های شناسایی الگو (Pattern recognition receptors, PRR) شناخته می‌شوند و نقش ضروری در سیستم ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. این رسپتورها به‌وسیله‌ی بیشتر سلول‌های ایمنی و سلول‌های اپی‌تلیال بیان می‌شوند.<sup>۱۰</sup> این رسپتورها به‌طور طبیعی موتیف‌های مولکولی حفاظت‌شده (الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن) مولکول‌های عفونی را شناسایی می‌کنند.<sup>۱۱</sup> تاکنون ۱۳ نوع TLR شناسایی شده است که از بین آن‌ها TLR2,4,5,9 مهم‌تر هستند. TLR2 لیپوپلی‌ساکارید، گلیکولیپید و موتیف‌های پپتیدوگلیکان را در دیواره‌ی سلولی شناسایی می‌کند. TLR4 نیز شناسایی لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های گرم منفی را بر عهده دارد.<sup>۱۲،۱۳</sup>

سالمونلا /انتریتیدیس، باسیل گرم منفی و یکی از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه است که از معمول‌ترین سرووار سالمونلا در ایجاد عفونت، در جهان بشر به‌شمار می‌رود. این باکتری علت اصلی بیماری منتقله از راه غذا در طی دهه‌ی اخیر به‌شمار می‌رود که در تمام سطح جهان جدا شده است. در حقیقت عفونت سالمونلا /انتریتیدیس یک مشکل بزرگ و چشمگیر در سلامت عمومی به‌شمار می‌آید.<sup>۱۴</sup> همان‌طور که بیان شد سالمونلا /انتریتیدیس باسیل گرم منفی بدون فلاژل است و به‌همین دلیل TLR2,4 نقش مهم و ضروری در شناسایی آن و فعال‌سازی سیستم ایمنی ذاتی در انسان پس از مواجهه با این باکتری برعهده دارند. همچنین سایتوکین‌های تولیدشده پس از

استفاده شد. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) نتایج داده‌های کمی براساس میانگین سه بار تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت.  $P < 0/05$  معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

پس از آنکه سلول‌ها در پلیت سلولی شمارش شدند، پس از گذشت سه روز انکوباسیون و پیش از انجام هر کاری پلیت کشت سلولی مورد نظر در زیر میکروسکوپ وارونگر مشاهده شد تا سلول‌ها از لحاظ مورفولوژیکی بررسی و دیده شوند که یافته‌ها نشانگر عدم وجود آلودگی در چاهک‌ها بود (شکل ۱).

بررسی تغییرات بیان ژن TLR2 پس از شش ساعت نشان داد که وقتی سلول‌های عفونی نشده با پاتوژن، با سویه‌های پروبیوتیکی مواجه شدند، بیان TLR2 به صورت معنادار ( $P < 0/05$ ) افزایش یافت. که این افزایش نشانگر ایمنی‌زا بودن این دو سویه پروبیوتیکی بود. این افزایش بیان در TLR4 نسبت به TLR2 با شدت کمتری دیده شد.

اما سلول‌های HT29 ای که از پیش با دو باکتری پروبیوتیکی تیمار شده بودند، پس از آلوده شدن با سالمونلا انترتیبیدیس در مدت زمان دو و چهار ساعت، کاهش معناداری در میزان بیان ژن TLR2 از خود نشان دادند ( $P < 0/05$ )، اگرچه این کاهش در سلول‌های تیمار شده با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به سلول‌های تیمار شده با لاکتوباسیلوس کازیبی، شدت بیشتری داشت. در مورد TLR4 هم همین نتایج دیده شد، اما کاهش در بیان ژن TLR2 نسبت به TLR4 بیشتر بود.

سلول‌های HT29 که از پیش با سالمونلا انترتیبیدیس عفونی شده بودند،

ساعت قرار داده شدند. سلول‌های HT29، در چهار پلیت متفاوت و به صورت Triplicate، با رقت  $10^7$  CFU/ml از سالمونلا انترتیبیدیس که به وسیله‌ی PBS تهیه شده بود، مجاور و به عبارتی عفونی شده، و پس از آن غلظت  $10^7$  CFU/ml از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در هر یک از زمان‌های (صفر، دو و چهار ساعت پس از ایجاد عفونت) به سه عدد از چاهک‌ها اضافه گردید.

پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری RNA total سلول‌های HT29، پس از حضور ۵٪  $CO_2$  و فشار ۹۵٪ اتمسفر) برای سنجش کمی میزان بیان ژن TLR2,4 با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA، استخراج شده و پس از آن با استفاده از کیت سنتز Complementary DNA (CDNA به CDNA تبدیل شده و در نهایت ژن‌های یادشده برای quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) آماده و اندازه‌گیری انجام گردید. در ضمن در این مطالعه از ژن بتا اکتین که در همه‌ی سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد به عنوان ژن پایه و کنترل استفاد گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده برای Real-time PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

بدین ترتیب پس از درمان سلول‌های HT29 آلوده با سالمونلا انترتیبیدیس، با پروبیوتیک‌های مذکور میزان کمی بیان ژن TLR2,4 در سطح mRNA در هر یک از زمان‌های در نظر گرفته شده، بررسی و با هم مقایسه شده و تاثیر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازیبی در زمان‌های مختلف روی آن مشخص شد. در نهایت نتایج حاصل با توجه به بررسی و تحلیل‌های آماری بیان می‌شوند.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از SPSS software, version 21 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و GraphPad Prism 4 software

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای Real time PCR

ژن	توالی پرایمر	دمای آنیلینگ	رفرانس
TLR2	۳' - GCA GAA GCG CTG GGG AAT GG-۵	۵۴	۱۳
	۳' - GGA TGC CTA CTG GGT GGA GAA-۵		
TLR4	۳' GGT GGA AGT TGA ACG AAT GG ۵	۵۳	۱۳
	۳' CCA GCA AGA AGC ATCAGG TG ۵		
$\beta$ -actin	۳' GCTCTGGCTCCTAGCACCAT ۵	۵۵	۱۸
	۳' GCCACCGATCCACACAGAGT ۵		

به‌تنهایی و در مجاورت با هم، تحت درمان قرار دادند و تاثیر آن‌را روی مسیر سیگنالینگ TLR4 مورد بررسی قرار دادند. آنالیز حاصل از وسترن بلات نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوس فعالیت مسیرهای مختلف سیگنالینگ TLR4 را در سلول‌های Caco-2 سرکوب می‌کند.<sup>۲۱</sup>

در مطالعه‌ای که توسط Bermudez-Brito و همکاران انجام گرفت، آن‌ها برای بررسی اثرات ایمونولوژیکی یفیدوباکتریوم پروه CNCM-4035 روی سلول‌های دندریتیک روده‌ی انسانی در پاسخ به سالمونلا تیفی، این سلول‌ها را با سالمونلا عفونی کرده و سپس در طی یک آزمایش، آن‌ها را با باکتری زنده‌ی پروبیوتیک و در آزمایش دیگر آن‌ها را با سوپرناتانت، مجاور کرده و پس از انکوباسیون، ترشح سایتوکین‌ها را به‌وسیله‌ی الیزا و بیان ژن‌های TLR را توسط Real-time RT PCR آنالیز کردند. نتایج حاکی از آن بود که سوپرناتانت در دندریتیک سل‌های روده‌ی انسان در چالش با سالمونلا تیفی، باعث کاهش در مقدار IL-6,12 شده اما بیفیدوباکتریوم زنده القاکننده‌ی قوی‌تری برای IL 6,8,10 بود. از طرف دیگر CFS باعث برگرداندن سطح TGFβ به حالت اول در حضور سالمونلا شد. همچنین مشخص شد که بیفیدوباکتریوم زنده باعث افزایش TLR2,4,9 در حضور سالمونلا شده ولی سوپرناتانت آن TLR1,2,5,9 را افزایش می‌دهد. البته نتایج نشان داد که افزایش TLR9 به‌وسیله‌ی سوپرناتانت بیشتر بود.<sup>۲۲</sup>

در مطالعه‌ای که توسط Castillo و همکاران انجام شد، نقش لاکتوباسیلوس کازی در جلوگیری از عفونت سالمونلا تیفی موریوم در موش BALB/c بررسی شد. بررسی و اندازه‌گیری سایتوکین‌ها در روزهای مختلف پس از درمان با پروبیوتیک‌ها و به‌روش ایمونوهیستوشیمی، نشان داد که تزریق پروبیوتیک به موش سالم، بیان ژن‌های TLR2,4,9 را افزایش داده و باعث افزایش تولید و ترشح TNFα, IFNγ, IL10 در پلاک‌های پیر می‌شود. اما پس از عفونت با سالمونلا تیفی موریوم و به‌دنبال تزریق دوباره‌ی پروبیوتیک، میزان به‌وسیله‌ی مدولاسیون پاسخ التهابی، حمایت شده و سطح TNFα کاهش یافته و تولید IL6, IL10, INFγ در لامینا پروپریای روده‌ی کوچک افزایش داشت.<sup>۲۳</sup>

در مطالعه‌ای که توسط Malago و همکاران انجام شد، آن‌ها ابتدا سلول‌های Caco2 آدنوکارسینوما‌ی انسانی را با لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پلانناروم به‌عنوان پروبیوتیک درمان کردند. در مرحله‌ی بعدی آن‌ها به‌صورت جداگانه این سلول‌ها را با سالمونلا انتریتیدیس عفونی کردند و در آزمایش سوم این دو پروبیوتیک و سالمونلا



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی سلول HT29، پس از کشت سلولی

پس از درمان با لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌مدت دو و چهار ساعت، کاهش معناداری در میزان بیان TLR2 نشان دادند ( $P < 0.05$ ) که این کاهش در زمان انکوباسیون چهار ساعت نسبت به انکوباسیون دو ساعته و در درمان با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به لاکتوباسیلوس کازی با شدت بیشتری مشاهده شد. در مورد TLR2 هم نتایج به‌همین صورت بود، با این تفاوت که این میزان کاهش در بیان ژن TLR2 بیشتر از TLR4 بود.

## بحث

امروزه با توجه به عوارض زیاد داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، نقش بسزای پروبیوتیک‌ها در درمان بسیاری از عفونت‌ها یکی از پر ابهام‌ترین و داغ‌ترین مسایل روز پزشکی به‌شمار می‌رود.<sup>۱۹</sup> در مطالعه‌ای که Ganguli و همکاران انجام دادند، بیان ژن‌های TNFα, IL 1β, IL8 در روده‌ی جنین انسان که در مجاورت با باکتری زنده‌ی لاکتوباسیلوس رامنوس GG قرار گرفته بود، به‌وسیله‌ی qPCR اندازه‌گیری شد. آن‌ها مشاهده کردند که لاکتوباسیلوس رامنوس GG به‌طور معناداری تولید سایتوکین‌های التهابی در پاسخ به باکتری‌های پاتوژن و سیگنال‌های پیش‌التهابی را در سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ی جنین انسان کاهش می‌دهد.<sup>۲۰</sup> در مطالعه‌ای که توسط Finamore و همکاران انجام گرفت، آن‌ها سلول‌های Caco-2 را با انتروتوکسیژنیک/اشرشیاکلی، لاکتوباسیلوس رامنوس و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنوس، هر کدام

بیان این ژن، پس از شش ساعت انکوباسیون، نشان داد که وقتی این سلول‌های سالم با دو پروبیوتیک یادشده درمان شدند، بیان این ژن به‌طور چشمگیری بالاتر رفت و تفاوت معناداری حاصل شد، در حقیقت این افزایش معنادار نشان‌دهنده‌ی خواص ایمنی‌زا بودن و نقش افزایشی این دو پروبیوتیک برای تقویت سیستم ایمنی و نقش تنظیمی مثبت این دو است. اما این افزایش معنادار در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به لاکتوباسیلوس کازیی بیشتر دیده شد که گویای تاثیر بیشتر ایمنی‌زایی این پروبیوتیک است. ژن TLR2 همان‌طور که گفته شد از خانواده‌ی PRRها و یک ژن دخیل در سیستم ایمنی ذاتی است و این بدین معناست که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و به‌مقدار کمتری لاکتوباسیلوس کازیی سیستم ایمنی ذاتی را تقویت می‌کند تا قدرت مقابله‌ی بدن بر علیه عامل عفونی وارد شده افزایش یابد.

نتایج بالا در مورد ژن TLR2، در مورد بیان ژن TLR4 هم صدق می‌کرد با این تفاوت که چگونگی نقش درمانی این دو پروبیوتیک، با کاهش بیان ژن TLR2 نقش پررنگ‌تری دارد. به‌عبارت دیگر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازیی بر روی بیان ژن TLR2 اثر کاهنده‌ی بیشتری نسبت به ژن TLR4، در سلول‌های عفونی با سالمونلا انتریتیدیس دارد.

پس از مقایسه‌ی نتایج مطالعات صورت‌گرفته‌ی پیش که در بالا به آن‌ها اشاره شد و نتایج حاصل از این مطالعه، مشخص شد که نتایج، به‌صورت کاملاً هماهنگی با هم همخوانی داشتند.

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی، پروبیوتیک‌های بومی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643 و لاکتوباسیلوس کازیی PTCC 1608 دارای اثر چشمگیر ضدالتهابی در برابر بیماری‌زایی باکتری سالمونلا انتریتیدیس هستند. اگرچه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643 فعالیت ضدالتهابی قوی‌تری را نسبت به لاکتوباسیلوس کازیی در این مطالعه از خود نشان داد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثر سویه‌های بومی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس کازیی PTCC 1608 بر روی بیان ژن TLR2,4 در HT29 intestinal epithelial cell در چالش با سالمونلا انتریتیدیس در شرایط آزمایشگاهی" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به‌شماره ۲۶۶۲۷ می‌باشد.

انتریتیدیس را با هم روی Caco2 cell کشت دادند و در مرحله‌ی آخر این پژوهشگران سالمونلا انتریتیدیس و سوپرناتانت را با هم روی این سلول‌ها کشت دادند و پس از آن سطح IL-8 در هر یک از آزمایشات را توسط الایزا و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که سالمونلا انتریتیدیس و هر کدام از لاکتوباسیلوس‌ها به‌تنهایی یک افزایش وابسته به دوز در سطح IL-8 را از خود نشان دادند. اما هیچ‌یک از این دو پروبیوتیک‌ها اثری روی رشد IL-8 القا شده توسط سالمونلا نداشتند، ولی سوپرناتانت آن‌ها باعث کاهش چشمگیری در سطح IL-8 القا شده توسط سالمونلا انتریتیدیس گردید.<sup>۲۴</sup>

در مطالعه‌ای که توسط Nandakumar و همکاران انجام شد، ایزوله‌های کلینیکی سالمونلا تیغی موریوم از بیماران، جدا شده و به کشت سلول HT29 تزریق شد. سپس سلول‌های عفونی شده با لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلاتناروم درمان شدند. این پژوهشگران به‌وسیله‌ی الایزا سطح IL-8 و دیگر کمونین‌ها مانند CXCL1, CXCL5, CCL5 را اندازه‌گیری کردند. سطح بیان mRNA TLR2,4,5,9 و CXCL1, CXCL5, CCL5 هم به‌وسیله‌ی روش Quantitative real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج بدین‌صورت بود که میزان ترشح IL-8 القا شده توسط این باکتری در HT29 افزایش یافت اما درمان این سلول‌ها با لاکتوباسیلوس به‌تنهایی، اثر افزایشی روی ترشح IL-8 نداشت. لاکتوباسیلوس‌ها پاسخ ایترلوکین هشت القا شده توسط سالمونلا تیغی موریوم را در سلول‌های HT29 مهار کردند. نتایج آزمایشات دیگر نشان دادند که سالمونلا تیغی موریوم بیان mRNA TLR4 را در سطح سلول‌های HT29 تنظیم مثبت کرد و با اضافه کردن لاکتوباسیلوس‌ها افزایش بیان در این ژن‌ها دیده شد. سطح TLR2,5,9 با حضور سالمونلا تیغی موریوم به‌طور چشمگیری افزایش یافت.<sup>۲۵</sup>

آنالیز و بررسی‌های حاصل از Real-time PCR نشان داد که وقتی سلول سالم HT29 با سالمونلا انتریتیدیس مواجه و شش ساعت انکوبه شد، LPS دیواره‌ی سلولی این باکتری به این گیرنده‌های غشایی خود در سطح روده (HT-29) متصل شده و سلول HT29 میزان بیان ژن TLR2,4 خود را نسبت به حالت عادی افزایش داد. تا بدن ایمنی خود را افزایش داده، سایتوکین‌های ایمنی تولید و بدن با عامل عفونی مقابله کند.

اندازه‌گیری نسبی بیان TLR2 و نتایج آنالیز داده‌های مربوط به

## References

- Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006;7(2):73-89.
- Karamese M, Aydin H, Sengul E, Gelen V, Sevim C, Ustek D, et al. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model. *Iran J Immunol* 2016;13(3):220-8.
- Kortnerink JJ, Ockeloen L, Benninga MA, Tabbers MM, Hilbink M, Deckers-Kocken JM. Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* 2014;103(4):365-72.
- Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* 2011;17(6):369-74.
- Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Nahui Palomino RA, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-candida activity. *PLoS One* 2015;10(6):e0131220.
- Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, et al. Lactobacillus gasseri SBT2055 induces TGF- $\beta$  expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One* 2014;9(8):e105370.
- Kuugbee ED, Shang X, Gamallat Y, Bamba D, Awadasseid A, Suliman MA, et al. Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer. *Dig Dis Sci* 2016;61(10):2908-2920.
- Zavala L, Golowczyc MA, van Hoorde K, Medrano M, Huys G, Vandamme P, et al. Selected Lactobacillus strains isolated from sugary and milk kefir reduce Salmonella infection of epithelial cells in vitro. *Benef Microbes* 2016;7(4):585-95.
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007;118(3):264-73.
- Sharifi L, Aghamohammadi A, Mohsenzadegan M, Rezaei N, Zavareh FT, Moshiri M, et al. Immunomodulation of TLR2 and TLR4 by G2013 ( $\beta$ -L-Guluronic acid) in CVID patients. *Int J Pediatr* 2017;5(7):5327-37.
- Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 2004;34(2):73-82.
- Sharifi L, Mohsenzadegan M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Zavareh FT, Bokaie S, et al. Immunomodulatory effect of G2013 ( $\alpha$ -L-Guluronic acid) on the TLR2 and TLR4 in human mononuclear cells. *Curr Drug Discov Technol* 2018;15(2):123-31.
- Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT; Microbiology and Gut Biology Group; Tayside Tissue and Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 2005;115(4):565-74.
- Eshraghi S, Soltan Dalall M M, Fardsanci F, Zahraei Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2010;67(12):876-82.
- Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* 2008;198(1):109-14.
- Moshiri M, Dallal MMS, Rezaei F, Douraghi M, Sharifi L, Noroozbabaei Z, et al. The Effect of Lactobacillus acidophilus PTCC 1643 on Cultured Intestinal Epithelial Cells Infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Osong Public Health Res Perspect* 2017;8(1):54-60.
- Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect* 2001;3(14-15):1191-200.
- Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S, et al. Dampening of death pathways by schnurri-2 is essential for T-cell development. *Nature* 2011;472(7341):105-9.
- Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):123-9.
- Ganguli K, Collado MC, Rautava J, Lu L, Satokari R, von Ossowski I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res* 2015;77(4):528-35.
- Finamore A, Roselli M, Imbinto A, Seeboth J, Oswald IP, Mengheri E. Lactobacillus amylovorus inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic Escherichia coli via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal Caco-2 cells and pig explants. *PLoS One* 2014;9(4):e94891.
- Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, et al. Cell-free culture supernatant of Bifidobacterium breve CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with Salmonella typhi through TLR activation. *PLoS One* 2013;8(3):e59370.
- Castillo NA, Perdígón G, de LeBlanc AdM. Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* 2011;11(1):177.
- Malago J, Tooten P, Koninkx J. Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Benef Microbes* 2010;1(2):121-30.
- Nandakumar N, Pugazhendhi S, Ramakrishna B. Effects of enteropathogenic bacteria & lactobacilli on chemokine secretion & Toll like receptor gene expression in two human colonic epithelial cell lines. *Indian J Med Res* 2009;130(2):170-8.

## Evaluation of the effect of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 on the TLR2 and TLR4 expression in HT29 cells infected with *Salmonella enteritidis*

Mohammad Mehdi Soltan Dallal  
Ph.D.<sup>1,2\*</sup>

Mona Moshiri M.Sc.<sup>1</sup>

Abbas Mirshafiey Ph.D.<sup>3</sup>

Masoumeh Douraghi Ph.D.<sup>1</sup>

Farhad Rezaie Ph.D.<sup>4</sup>

Mehrdad Gholami Ph.D.<sup>5</sup>

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

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

3- Department of Immunology,  
School of Public Health, Tehran  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.

4- Department of Virology, School  
of Public Health, Tehran University  
of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- Department of Microbiology and  
Virology, Faculty of Medicine,  
Mazandaran University of Medical  
Sciences, Sari, Iran.

\* Corresponding author: Department of  
Pathobiology, School of Public Health,  
Tehran University of Medical Sciences,  
Poursina St., Qods St., Keshavarz Blvd.,  
Tehran, Iran.  
Tel: +98 21 88992971  
E-mail: msoltandallal@gmail.com

### Abstract

Received: 23 May 2018 Revised: 30 May 2018 Accepted: 09 Feb. 2019 Available online: 19 Feb. 2019

**Background:** Probiotics are living organisms that are beneficial for human health. *Lactobacillus* species has been considered as probiotic bacteria due to their adjustment of human immune responses and therapeutic effects in inflammatory disorders. The aim of the present study was to evaluate the effects of *Lactobacillus* probiotic strains on toll-like receptors (TLR2 and TLR4) expression in HT29 cell line (a human colon cancer cell line) infected with *S. enteritidis*.

**Methods:** This experimental study was done in Food Microbiology Research Center of Tehran University of Medical Sciences, Iran, from March 2016 to February 2017. In this study, two strains of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 were used. HT29 cells were cultured in RPMI medium containing fetal bovine serum and antibiotics. Then, the cells were treated with the *Lactobacillus* strains, after or before challenge with *S. enteritidis*. After total RNA extraction and cDNA synthesis, the capacity of probiotic lactobacilli to modulate TLR2 and TLR4 expression on treated and un-treated HT29 cells were assessed quantitatively using Real-time polymerase chain reaction technique with specific primers.

**Results:** Our findings indicated that after treatment of non-infected HT29 cells, with both the probiotics, the expression of TLR2 and TLR4 genes significantly increased. In contrast, the expression of these two genes in HT29 cells which were infected with *S. Enteritidis* was significantly reduced before and after treatment with each one of the probiotic bacteria. The anti-inflammatory effect of probiotic lactobacilli on *S. enteritidis* were confirmed in tests. This study showed that *L. acidophilus* and *L. casei* play a major role in boosting the innate immune responses, the TLR2 and TLR4 expression levels also decreased, pre and post-infection with *S. enteritidis*.

**Conclusion:** According to the results, both *Lactobacillus* strains have remarkable anti-inflammatory effect in pathogenicity of *S. enteritidis*, but *L. acidophilus* display greater anti-inflammatory activity than *L. casei* in this work. Additional in vivo and in vitro studies are required to further elucidate the mechanisms underlying this anti-inflammatory effect.

**Keywords:** *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, probiotics, *Salmonella enteritidis*, toll-like receptors.