تأثیر متابولیت های *Lactobacillus rhamnosus* GG بر روی رده سلول سرطانی CacoII

لادن پارساسرشت*[۱]، محمدرضا فاضلی[۲]، نسرین صمدی[۲]، حسین جمالی فر[۲]، اکرم عیدی[۳] و حمیده محمودی اصل زاده[۱]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

[۲] تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو و غذا

[۳] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۰

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری متابولیت های *Lactobacillus rhamnosus* GG (باکتری پروبیوتیک) بر روی رشد رده سلولهای سرطانی CacoII بود. پس از بررسی صحت جنس و گونه باکتری از آن کشت آبگوشتی در محیط MRS تهیه و از هرکدام از کشتهای ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت دو سوپرناتانت آماده شد، یکی دارای pH نرمال(pH=۴) بود و دیگری با استفاده از NaoH 1N به pH خنثی(pH= ۷) رسانده شد .سلولهایCacoII در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به مقدار$۱۰^۳ \times ۸$ سلول در هر چاهک کشت داده شد و سوپرناتانت های به دست آمده در غلظتهای ۱۰۰ ،۲۰۰ و۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بر روی سلولهای CacoII تلقیح شدند. بر اساس این مطالعه به طور میانگین متابولیت های *Lactobacillus rhamnosus* GG در غلظتهای ۱۰۰ ،۲۰۰ و۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بترتیب ۶۰/۸ ، ۷۲/۵ و ۸۲/۱ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کردند.

واژه های کلیدی: *Lactobacillus rhamnosus* GG ،CacoII ،پروبیوتیک

* نویسنده مسئول، تلفن : ۸۸۴۰۵۴۰۶ پست الکترونیکی: pinksky_ll0@yahoo.com

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که سرطان کولون شیوع زیادی در کشورهای توسعه یافته دارد و در قرنهای اخیر به طور افزاینده ای افزایش پیدا کرده است (۶) .الگوهای رژیمی مانند چربی زیاد و فیبر کم از عوامل مهم ایجاد سرطان کولون هستند (۴) . مجموعه متنوعی از میکروفلور در روده انسان نقش مهمی را در برابر بیماریها و سلامت انسان بازی می‌کنند. تواناییهای متابولیکی این میکروفلور سبب تولید آنزیمهای باکتریایی مانند β- گلوکورونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، α-7 دهیدروکسیلاز و کلسترول دهیدروژناز می‌شود که در شکل گیری پروسه کارسینوژنیک با آزاد کردن کارسینوژن‌ها در روده نقش دارند (۵ و ۱۲). *Escherichia coli* یکی از ساکنان نرمال در روده انسان است که با به دست آوردن فاکتور های ویرولانس مانند فاکتور نکروز دهنده سمیI بسیار بیماری زاست و در ایجاد سرطان کولون با تولید توکسین خطرناک و فاکتور نکروز دهنده سمیI نقش مهمی بازی می کند (۱۵). در نقطه مقابل، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده در مکملهای غذایی هستند که اگر به مقدار کافی مصرف شوند برای سلامت انسان مفید می باشند (۱۴). باکتریهای پروبیوتیک که به عنوان غذاهای عملکردی نام برده می‌شوند از گروه باکتریهای اسید لاکتیک هستند(LAB). مصرف فرآورده‌های تخمیری شیر که در آنها از پروبیوتیک‌های اسید لاکتیک به عنوان استارتر استفاده می‌شود می‌تواند نقش مهمی در

کاهش ریسک ابتلا به سرطان کولون بازی کند(۱۳). به همین دلیل گسترش انتخاب پروبیوتیک‌ها و استفاده از آنها در مکملهای غذایی در راستای بهبود ارزش غذایی و سلامت انسان (به طور مثال جلوگیری از سرطان کولون) این روزها در کانون توجه قرار گرفته است. در این مطالعه سعی بر این شده است که نقش *Lactobacillus rhamnosus* GG (باکتری پروبیوتیک) در جلوگیری از سرطان کولون اثبات شود.

مواد و و روشها

باکتری و شرایط رشد: *L. rhamnosus* GG از آزمایشگاه پروبیوتیک و داروسازی دانشگاه تهران تهیه شد و مواد مورد استفاده برای کشت باکتری محصول شرکت Merck آلمان بود . تشخیص جنس و گونه با بررسی ویژگیهای ظاهری کلنی، رنگ آمیزی باکتری به روش گرم، تستهای بیوشیمیایی مثل تست کاتالاز وتست تخمیر قند ها انجام شد.*L. rhamnosus* GG با غلظت $۲/۵ \times ۱۰^{۴}$ Cfu/ml در ۳۰۰ سی سی محیط مایع کشت MRS کشت داده شد و پس از گذشت هر ۲۴ ساعت (تا ۷۲ ساعت) فاکتور های شمارش کلی(Total count) و pH محیط کشت حاوی *L. rhamnosus* GG به طور جداگانه اندازه گیری شد . در هر زمان نمونه برداری، ۵۰ سی سی از محیط کشت حاوی *L. rhamnosus* GG در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ(Heraeus) شد و مایع رویی(سوپرناتانت)از فیلتر ۰/۲۲ میکرومترگذرانده شد .سوپرناتانت به دست آمده از محیط کشت به دو قسمت تقسیم شد به طوری که یکی از سوپرناتانت ها دارای pH= ۴ بود و دیگری با استفاده از NaoH 1N به pH =۷ رسانده شد. در انتها شش سوپرناتانت به دست آمد که ازهمه آنها ذخیره فریزری تهیه گردید. Total Count با روش پورپلیت اندازه گیری شد.

کشت سلول: سلول CacoII (Human colonic adenocarcinoma cells) از آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه تهران به صورت ذخیره فریزری تهیه شد و مواد مورد استفاده برای کشت باکتری محصول شرکت GIBCO آمریکا بود . سلولها در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI)غنی شده با ۱۰ درصد Fetal bovine serum(FBS)، ۲mM L.گلوتامین، ۱۰۰ Uml^{-1} پنی سیلین و ۱۰۰ $mgml^{-1}$ استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد Co_2 به مدت چهار روز نگهداری شد. سپس فلاسک حاوی سلول پاساژ(Subculture) داده شد . برای این منظور از تریپسین 1X برای جداسازی سلولها از دیواره فلاسک استفاده شد و بعد از جداسازی سلولها با محیط RPMI رقیق شدند .سوسپانسیون حاصل در rpm ۱۵۰۰۰ دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در مقداری RPMI تعلیق شد و تعداد سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار در ۱ میلی لیتر از آن شمارش گردید.

سلولهای Caco II به میزان ۸×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک میکروپلیت کشت داده شدند و سوپرناتانت های به دست آمده از کشت ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG با سه تکرار در سه غلظت ۲۰۰،۱۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر به ترتیب به سلولهای Caco II در میکروپلیت تلقیح شدند. یک ردیف از میکروپلیت به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد و سلولهای Caco II با همان میزان ذکر شده به همراه محیط کشت RPMI تلقیح شدند و به عنوان شاهد منفی به یک ردیف از میکروپلیت محیط کشت RPMI تلقیح گردید. میکروپلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد Co_2 نگهداری شدند. پس از این مدت سلولهای Caco II با کریستال ویوله رنگ آمیزی وتثبیت شدند و سلولهای مرده با شستشو حذف شدند. میزان جذب نوری سلولهای رنگ شده CacoII در طول موج nm ۵۷۰ به وسیله دستگاه الایزاخوان (Anthos 2020) اندازه گیری شد. سپس با

استفاده از محاسبات ریاضی و جذب نوری سلولهای شاهد درصد سلولهای زنده محاسبه شد.

آنالیز آماری: محاسبات آماری در تعیین اختلاف معنی دار، بین سه فاکتور زمان ،غلظت و pH به وسیله نرم افزار ANOVA انجام شد(ارزش P <۰/۰۰۰۱). لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات برای دقت در محاسبات آماری ۳ بار تکرار شده است.

نتایج

شناسایی باکتری از نظر صحت جنس و گونه: کلنی *L. rhamnosus* GG کرم رنگ ، محدب و با اندازه ۲-۵ میلی متر مشاهده شد. در رنگ آمیزی Gram به صورت باسیلهای گرم مثبت، باریک و بلند، به صورت جفت یا زنجیره های کوتاه رؤیت شدند. کاتالاز منفی و فاقد حرکت بود و قادر به تخمیر ملبیوز ، رافینوز و گزیلوز نبود.

شمارش کلی(Total Count) در محیط کشت مایع MRS *L. rhamnosus* GG نشان داد که جمعیت باکتریها در هر ۲۴ ساعت کاهش داشتند شکل (۱) و جدول (۱). همچنین pH محیط کشت نیز به تدریج کاهش نشان داد شکل (۲)و جدول (۲) *L. rhamnosus* GG بهترین رشد خود را در pH بین ۶/۵ تا ۴/۵ داراست و در pH زیر ۴ قادر به زندگی نیست.

جدول ۱- شمارش کلی(Total Count) در محیطهای کشت ۰، ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG در محیط آبگوشت MRS. اعداد گزارش شده میانگین سه نمونه اندازه گیری شده هستند.

زمان	Total count
۰	$۲/۵\times۱۰^{۴}$
۲۴ ساعت	$۱/۸۴\times۱۰^{۹}$
۴۸ ساعت	$۲/۲۵\times۱۰^{۸}$
۷۲ ساعت	$۱/۹\times۱۰^{۸}$

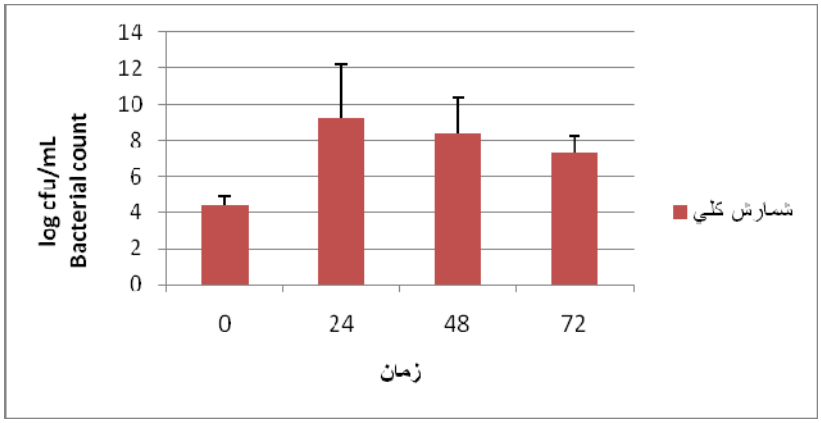
جدول ۲ - تغییرات pH در محیطهای کشت ۰، ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG در محیط آبگوشت MRS. اعداد گزارش شده میانگین سه نمونه اندازه گیری شده هستند.

زمان	p H
۰	۶/۵
۲۴ ساعت	۳/۸
۴۸ ساعت	۳/۶
۷۲ ساعت	۳/۴

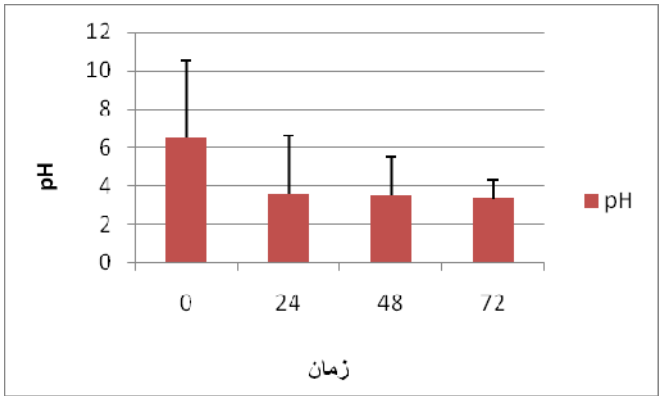
تأثیر سوپرناتانت حاصل از *L. rhamnosus* GG بر روی رده سلول سرطانی CacoII : تلقیح سوپرناتانت حاصل از کشت ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG در محیط آبگوشت MRS با دو pH ۴ و ۷ در سه غلظت ۲۰۰،۱۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر /میلی لیتر بر روی سلولهای سرطانی CacoII سبب مهار رشد این سلول سرطانی شد شکل(۳) و جدول(۳).

هدف از این مطالعه تأثیر متابولیت های حاصل از *L. rhamnosus* GG بر رده سلولهای سرطانی CacoII بود که پس از تأثیر دادن سوپرناتانت های به دست آمده از کشتهای ۴۸،۲۴و ۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG این نتیجه آشکار شد که این متابولیت ها قادر به مهار رشد سلولهای سرطانی بودند. در این مطالعه غلظت µl/mL ۱۰۰ سوپرناتانت نرمال حاصل از کشت *L. rhamnosus* GG در۲۴ ساعت ۵۶ درصد، در کشت ۴۸ ساعت ۶۱ درصد و در کشت ۷۲ ساعت ۶۳ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کردند. با توجه به نتایج آزمایشات می توان نتیجه گرفت که زمان می تواند یک فاکتور موثر باشد و با توجه به آنالیز آماری (جدول-۴) دارای افزایش معنی دار بود. ($p <۰/۰۰۰۱$) و به این معناست که با گذشت زمان و افزایش متابولیت ها اثر مهاری بر روی رشد سلولهای سرطانی CacoII افزایش پیدا کرد. با وجود کم شدن باکتریها پس از ۲۴ ساعت($۱/۸۴\times۱۰^{۹}$) ورسیدن آنها به مقدار $۲/۲۵\times۱۰^{۸}$ و $۱/۹\times۱۰^{۸}$ به ترتیب در ۴۸ و۷۲ ساعت، اثر مهاری آنها بر رشد سلولهای سرطانی CacoII

کمتر نشد بلکه افزایش پیدا کرد به طوری که سوپرناتانت حاصل از کشت ۲۴ ساعت *L. rhamnosus* GG توانست به طور میانگین ۶۰/۸ درصد، سوپرناتانت حاصل از کشت ۴۸ ساعت با میانگین ۷۱/۵ درصد و سوپرناتانت حاصل از کشت ۷۲ ساعت با میانگین ۸۲/۱ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کند. احتمالاً این موضوع بر این امر دلالت دارد که چون *L. rhamnosus* GG در ساعت ۲۴ در فاز سکون قرار داشته علاوه بر متابولیت های تولید شده در فاز لگاریتمی یک سری مواد داخل سلولی نیز در محیط رها شده که اثر مهاری را بالا برده است(سوپرناتانت ۲۴ ساعت در غلظت µl/mL ۱۰۰ با اثر مهاری ۵۶ درصد) ولی به مرور که فاز سکون به اتمام می رسد و وارد فاز مرگ می شود این تأثیر بیشتر می شود (سوپرناتانت های ۴۸و ۷۲ ساعت با اثر مهاری ۶۱ و۶۳ درصد)که شاید دلیل این امر این باشد که علاوه بر متابولیت های تولید شده در ساعتهای پیشین، به دلیل از بین رفتن باکتریها، یک سری مواد داخل سلولی در اثر مرگ باکتریها به سوپرناتانت اضافه شده که سبب افزایش اثر مهاری بر روی سلولهای سرطانی CacoII شده است. موضوع بعدی در مورد استفاده از سوپرناتانت ها با دو pH متفاوت است . سلولها به طور طبیعی با پایین آمدن pH و اسیدی شدن محیط دچار مرگ می شوند.



شکل ۱- شمارش کلی(Total Count)در محیطهای کشت ۰، ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG در محیط آبگوشت MRS. اعداد گزارش شده میانگین سه نمونه اندازه گیری شده هستند.

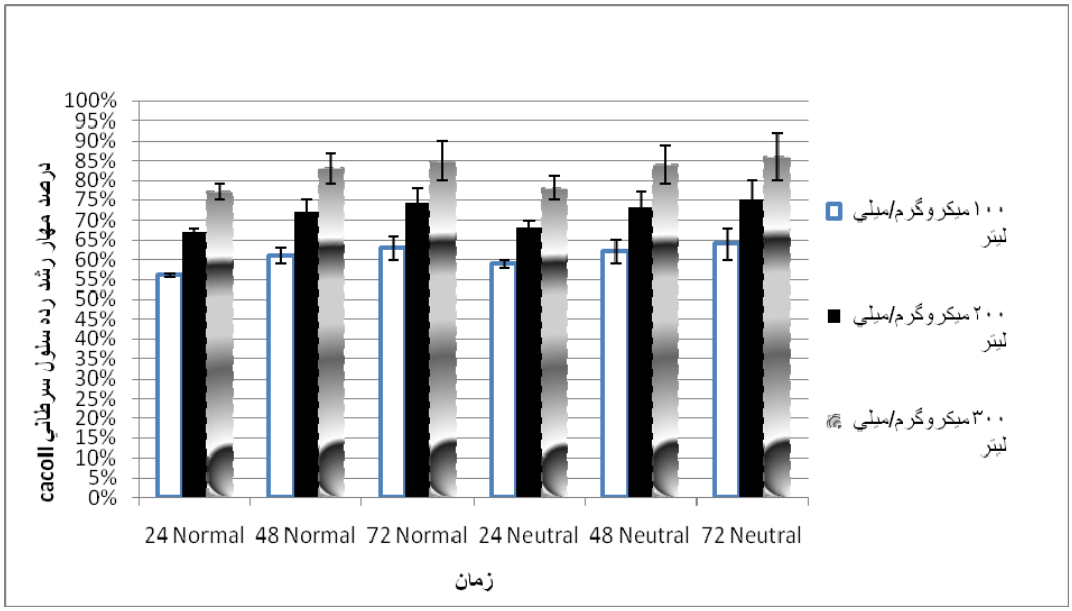


شکل- ۲ - تغییرات pH در محیطهای کشت ۰، ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG در محیط آبگوشت MRS. اعداد گزارش شده میانگین سه نمونه اندازه گیری شده هستند.

دلیل به کار بردن سوپرناتانت خنثی این بود که مشخص شود علت مرگ سلولهای CacoII حالت اسیدی سوپرناتانت نبوده است بلکه به دلیل ترکیبات موجود در سوپرناتانت بوده است. به طوری که در غلظت µl/mL ۱۰۰ سوپرناتانت حاصل از کشت ۲۴ ساعت *L. rhamnosus* GG با pH نرمال و خنثی به ترتیب تأثیری برابر ۵۶ درصد و ۵۹ درصد در مهار رشد سلولهای سرطانی CacoII داشتند و همین نتایج در مورد سوپرناتانت های حاصل از کشت ۴۸ و ۷۲ ساعت *L. rhamnosus* GG با دو pH نرمال و خنثی تکرار شد. سوپرناتانت ۴۸ و ۷۲ ساعت نرمال در غلظت µl/mL ۱۰ به ترتیب دارای اثر مهاری ۶۱ درصد و ۶۳ درصد بودند و سوپرناتانت ۴۸ ساعت با pH خنثی در همان غلظت ۶۲ درصد و سوپرناتانت ۷۲ ساعت با pH خنثی ۶۴ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کردند. از مقایسه تفاوتهای عددی ذکر شده این موضوع روشن شد که در شرایط خنثی سوپرناتانت *L. rhamnosus* GG توانایی بیشتری در مهار رشد سلولها داشته است و در آنالیز آماری(جدول-۴) تفاوت معنی داری بین اعداد حاصل از مهار رشد سلولهای CacoII به وسیله سوپرناتانت نرمال و خنثی وجود داشت($p < ۰/۰۰۰۱$) واین موضوع اشاره دارد بر اینکه احتمالاً شرایط اسیدی مانع از عملکرد یک سری از متابولیت ها شده است به طوریکه این متابولیت ها در شرایط خنثی و با حذف شرایط اسیدی توانستند تأثیر مهاری خود را اعمال کنند. مورد سوم تأثیر غلظتهای متفاوت سوپرناتانت *L. rhamnosus* GG بر روی سلول سرطانی CacoII است. به طوری که غلظت در آنالیز آماری (جدول-۴) دارای افزایش معنی دار ($p < ۰/۰۰۰۱$) بود به این معنا که هرچه غلظت سوپرناتانت افزایش پیدا کرد به تأثیر آن نیز افزوده شد. با افزایش غلظت سوپرناتانت از ۱۰۰ به µl/mL ۳۰۰، اثر مهاری آن بر روی سلول سرطانی CacoII افزایش پیدا کرد .به طوری که در غلظت µl/mL ۱۰۰ به طور میانگین اثر مهاری . ۶۰/۸ درصد، در غلظت µl/mL ۲۰۰ به طور میانگین اثر مهاری ۷۱/۵ درصد و در غلظت µl/mL ۳۰۰ به طور میانگین اثر مهاری ۸۲/۱ درصد بود. این اعداد نشان می دهد که اثر مهاری سوپرناتانت *L. rhamnosus* GG وابسته به دُز بوده و با افزایش غلظت اثر مهاری آن نیز زیاد شده است. از این بحث می توان این نتیجه را استنباط کرد که در این مطالعه سه متغیر زمان ،غلظت و pH بر روی تأثیر سوپرناتانت *L. rhamnosus* GG در مهار رشد سلول سرطانی CacoII مؤثر بودند.

جدول ۳- تأثیر سوپرناتانت حاصل از *L. rhamnosus* GG در غلظتهای۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بر روی رده سلول سرطانی CacoII با pH نرمال و خنثی.

زمان / درصد مهار سلولهای CacoII	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
غلظت µl/mL ۱۰۰ و pH برابر ۴	٪۵۶	٪۶۱	٪۶۳
غلظت µl/mL ۲۰۰ و pH برابر ۴	٪۶۷	٪۷۲	٪۷۴
غلظت µl/mL ۳۰۰ و pH برابر ۴	٪۷۷	٪۸۳	٪۸۵
غلظت µl/mL ۱۰۰ و pH برابر ۷	٪۵۹	٪۶۲	٪۶۴
غلظت µl/mL ۲۰۰ و pH برابر ۷	٪۶۸	٪۷۳	٪۷۵
غلظت µl/mL ۳۰۰ و pH برابر ۷	٪۷۸	٪۸۴	٪۸۶



شکل ۳ – درصد مهار سلول سرطانی CacoII تحت تأثیر سوپرناتانت حاصل از *rhamnosus* GG.*L* . سلولها ی CacoII با مقدار 8×10^{3} سلول در هر چاهک با سوپرناتانت حاصل از کشت ۲۴ ، ۴۸ و۷۲ ساعت *rhamnosus* GG.*L* در غلظتهای ۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر در دو حالت خنثی و نرمال تیمار شدند و برای مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند.میزان جذب نوری به وسیله دستگاه الایزا خوان در ۵۷۰nm اندازه گیری شد. اعداد گزارش شده میانگین سه نمونه اندازه گیری شده هستند.

جدول ۴– محاسبات آماری در تعیین اختلاف معنی دار، بین سه فاکتور زمان ،غلظت و pH بوسیله نرم افزار ANOVA- (ارزش P <۰/۰۰۰۱)

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۴۷۵۸/۸۳	۱۷	۲۷۹/۹۳	۶۲۹/۸۵	>۰/۰۰۰۱
A.غلظت	۴۲۲۵/۳۳	۲	۲۱۱۲/۶۷	۴۷۵۳/۵۰	>۰/۰۰۰۱
pH.B	۸/۱۷	۱	۸/۱۷	۱۸/۳۸	>۰/۰۰۰۱
C.زمان	۵۱۷/۳۳	۲	۲۵۸/۶۷	۵۸۲/۰۰	>۰/۰۰۰۱
AB	۱/۳۳	۲	۰/۶۷	۱/۵۰	۰/۲۳۶۷
AC	۲/۶۷	۴	۰/۶۷	۱/۵۰	۰/۲۲۲۷
BC	۱/۳۳	۲	۰/۶۷	۱/۵۰	۰/۲۳۶۷
ABC	۲/۶۷	۴	۰/۶۷	۱/۵۰	۰/۲۲۲۷
خطای خالص	۱۶/۰۰	۳۶	۰/۴۴		
مجموع	۴۷۷۴/۸۳	۵۳			

بحث

تأثیر متابولیت های حاصل از باکتریهای پروبیوتیک در مهار رشد سلولهای سرطانی ثابت شده است. بوتیرات تولید شده توسط *Butyrivibrio fibriosolvens* MDT-1 قادر به مهار رشد تومور در حیوانات بود(۱۱). همچنین پروپیونات و استات تولید شده توسط *Propionibacterium acidipropionici* قادر به ایجاد آپوپتوز در سلولهای سرطانی کولون است(۷). در سال ۲۰۰۹ در طی مطالعات Elise L. Ma ثابت شد که متابولیت های حاصل از باکتری پروبیوتیکی *Bacillus polyfermenticus* قادر به مهار رشد سلولهای سرطانی HT-29 (Human colon adenocarcinoma grade II cell

line) و Caco-2 هستند. او گزارش کرد مکانیسم دخیل در این امر کاهش بیان پروتئینهای ErbB2 وErbB3 (Epidermal growth factor receptor) و همچنین کاهش میزان mRNA کد کننده این پروتئینها ست (۱۰). فعالیت ضد توموری مواد موجود در لیزات *Lactobacillus bulgaricus* در سال ۱۹۹۵ کشف شد و Bogdanov در سال ۱۹۹۷ فعالیت ضد توموری بلاستولیزین (گلیکوپپتید دیواره سلولی *L.bulgaricus*) علیه سلولهای سرطانی SarcomaS180 ,Leukemia P-388, Plasmacytoma MOPC-315, Melanosarcoma B-16, Carcinoma LLC نشان داد (۳). Kim Ji-Uk در سال ۲۰۰۶ گزارش کرد اگزوپلی ساکارید حاصل از *L. rhamnosus* ATCC 9595 در فاز لگاریتمی به صورت متصل به سلول ۶۱ درصد و به صورت آزاد ۳۹ درصد و اگزوپلی ساکارید متصل به سلول در فاز سکون ۲۳ درصد و به صورت آزاد در محیط ۷۷ درصد وجود دارد. او ادعا کرد هر دو نوع اگزوپلی ساکارید باعث مهار رشد سلولهای سرطانی PANC-1 (Human pancreatic carcinoma epithelial-like cell line) و HT-29 (Human colon adenocarcinoma grade II cell line) در طی ۷۲ ساعت در *in vitro* شدند(۸). به طور جالب این دو نوع اگزوپلی ساکارید بر روی سلولهای سالم تأثیری نداشتند و همچنین تأثیر اگزوپلی ساکارید آزاد در مهار رشد دو رده سلول سرطانی بیشتر از اگزوپلی ساکارید متصل به سلول بود. او متوجه شد که تیمار سلولهای سرطانی به وسیله اگزوپلی ساکارید سبب تولید Caspase-3 در آنها در مقایسه با سلول کنترل بیشتر شده است. در نهایت پیشنهاد کرد که مهار رشد سلولهای سرطانی در نتیجه آپوپتوز بوده است (۸). همین طور در سال ۲۰۰۴ گزارش شد که سلول کامل یا عصاره سلولی *Bifidobacteriunm bifidum* BGN4 جدا شده از مدفوع انسان توانایی مهار رشد چندین رده سلول سرطانی را دارد. او موفق شد یک نوع پلی ساکارید از *B.bifidum* به نام BB-pol استخراج کند که توانایی مهار رشد رده سلول سرطانی کولون را در *in vitro* داشت (۱۶) و اخیراً Antonella ثابت کرد که عصاره سیتوپلاسمی *L. rhamnosus* GG سبب مهار رشد وتکثیر دو رده سلول سرطانی HGC-27 (سلول سرطانی معده) و DLD-1 (سلول سرطانی کولون) شده است (۱). در ارتباط با متابولیت های استخراج شده از پروبیوتیک ها Do Kyung Lee در سال ۲۰۰۸ گزارش کرد که بوتانول استخراج شده از *Bifidobacterium adolescentis* توانایی مهار رشد رده سلولهای سرطانی کولون (HT-29, Caco-II و SW480) را به ترتیب ۷۰،۳۰ و ۴۰ درصد را در غلظت ۲۰۰µl/mL داراست و این اثر وابسته به دُز است (۹). در مطالعه ای دیگر سلول تمایز نیافته HT-29 در حضور هر یک از باکتریهای *L. helveticus, Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus.* و یا مخلوط *Streptococcus thermophilus* و *L.bulgaricus* کشت داده شد و نتیجه به این صورت بود که *L.acidophilus* نه در تمایز سلول ونه در مهار رشد سلول HT-29 دخالت نداشت. سه باکتر ی دیگر سبب مهار رشد HT-29 شدند. بیشترین تأثیر را در مهار رشد HT-29 *L.helveticus* و *Bifidobacterium* داشتند .و به طور همزمان سبب افزایش دی پپتیدیل ترانسفراز IV (مارکر مهم و مؤثر در تمایز سلول HT-29) و آنزیمهای حاشیه بررسی (ساکارز، آمینوپپتیداز و آلکالین فسفاتاز) شدند.که این امر پیشنهاد می کند سلولها وارد فاز تمایز شده اند (۲).

منابع

1. Antonella O, Messa C,Linsalata M,Cavallini A,Russo F(2009) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines. *Immunopharmacol. Immunotoxicol. J* .**31**: 108-116.

2.Baricault L, Denariaz G, Houri JJ, Bouley C, Sapin C & Trugnan G(1995)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*.**16**:245–252.

3.Bogdanov I.G , Velichkov V.T, Gurevich A.I , Dalev P.G(1997)Antitumor action of glycopeptides from the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *Bull Exp Biol Med* .84:1750-1753.

4.Commane D,Hughes R,Shorrt C,Rowland I(2005)The potential mechanism involved in the anti-carcinogenic action of probiotics . *mutat Res*.**591**:276-289.

5.Ewaschunk JB,Walker JW,Diaz H,Madsen KL(2006)Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J Nutrition***.136**:1483-1487.

6.Gursoy O and Kinik O(2006)Probiotics:a new popular Option for cancer inhibition. *Int. J .Dairy Sci*.**1**:100-103.

7.Jan G,Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Metivier D, Kroemer G, Brenner C(2002)Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ*.**9**:179-88.

8.Ji-Uk K,Younghoon K,Kyoung-Sik H ,Se-Jong O, Kwang-Youn W, Jai-Neung K (2006)Function of cell-bound and released exopolysaccharide produced by Lactobacillus rhamnosus ATCC 9595. *J Microbiol.Biotechnol*.**16**: 939-945.

9.Lee do K, Jang S, Kim MJ, Kim JH, Chung MJ, Kim KJ, Ha NJ (2008)Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell line. *BMC Cancer*. **8**:310.

10.Ma EL, Choi YJ, Choi J, Pothoulakis C, Rhee SH, Im E. (2009) The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int. J .Cancer*.5: 487-490.

11.Ohkawara S, Furuya H, Nagashima K, Asanuma N, Hino T(2005) Oral administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J Nutr*. **135**: 2878-83

12.Rafter Joseph(2003)probiotics and colon cancer . *Best Pract Res Clin Gastroenterol***.17**:849-859.

13.Saikali J,Picard C,Feritas M ,Holt P(2004)fermented milks,probiotic cultures,and colon cancer. *Nutr Cancer*. **49**:14_24.

14.Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I(1998) Functional food Science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr*. **80**:147-171.

15.Travaglione S ,Fabbri A,Fiorentini C(2008)The Rho-activating CNF1 toxin from pathogenic *Escherichia coli* :A risk factor for human colon cancer development? *Infect Agent Cancer*. **3**:4.

16.You H.J,Oh DK and Ji GE (2004)Anticarcinogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS microbial Lett***.240**:131-136.

Effect of metabolites produced by *Lactobacillus rhamnosus* GG (probiotic bacteria) on the growth of human colon cancer cell line CacoII

Parsaseresht L.[1], Fazeli M.[2], Samadi N.[2], Jamalifar H.[2], Eidi A.[3] and Mahmudiaslzadeh H.[1]

1. Microbiology Dept., School of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of IRAN

2. Biopharmaceutical Control Dept., School of Pharmacology, Tehran University, Tehran, I.R. of IRAN

3. Biology Dept.,, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

In this study the inhibitory effect of metabolites produced by *Lactobacillus rhamnosus* GG (probiotic bacteria) on the growth of human colon cancer cell line CacoII was examined. After accuracy examination of bacterial genus and species MRS(DE Man ,Rogosa & Sharpe) broth culture from *L. rhamnosus* GG was prepared and two supernatant from MRS broth culture which was incubated for 24,48 and 72 hours were provided.One of these supernatant with normal pH(pH=4) and the other one with using NaoH 1N was reached to pH 7.CacoII cells were seeded on 96-well microplates at 8×10^3 cells/well and obtained supernatants at concentrations of 100,200 and 300 µl/mL were inoculated to CacoII cell culture. In average ,the metabolites of *L. rhamnosus* GG at concentrations of 100, 200 and 300 µl/mL inhibited the growth of CacoII cells by 60.8%,71.5% and 82.1% respectively.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus* GG, CacoII, probiotic