

Research Paper

Investigation of the Effect of *Lactobacillus Brevis* Bacteria on the Expression of *Rel A*, *IKB*, and *Casp3* Genes in HT29 Colon Cancer Cells



Hojat Adeli¹, *Changiz Ahmadizadeh¹, Mohammad Hossein Sadeghi Zali²

1. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
2. Department of Microbiology, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.



Citation Adeli H, Ahmadizadeh C, Sadeghi Zali M. [Investigation of the Effect of *Lactobacillus brevis* Bacteria on the Expression of *Rel A*, *IKB*, and *Casp3* Genes in HT29 Colon Cancer Cells (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(3):330-353. <https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3277.3>

<https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3277.3>



Received: 22 Feb 2022
Accepted: 04 May 2022
Available Online: 01 Jul 2022

Key words:
Colon cancer,
Lactobacillus bevis
bacteria, Gene
expression

ABSTRACT

Aims Studies have shown that probiotic bacteria inhibit the onset and progression of carcinogenesis through different pathways. Our objective in this study was to determine the effect of probiotic bacteria on the expression of growth-related genes *Rel A*, *IKB*, and *Casp3* in HT29 colon cancer cells

Methods & Materials In this study, the *Lactobacillus brevis* probiotic bacteria were first cultured, and after the supply of media conditioning, they were treated on HT29 cancer cells. The bacterium's cytotoxic effect (bacterial T cells) was investigated using a microculture tetrazolium test (MTT). DNA was extracted from the treated cells, and a DNA Ladder assay was performed. Also, the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) test was performed to show cell apoptosis. After ribonucleic acid (RNA) extraction and complementary DNA (cDNA) preparation to determine the mechanism of the effect of this bacterium on cellular signaling, the expression of growth-related genes *Rel A*, *IKB*, and *Cas3* was measured using a real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings The microculture tetrazolium (MTT) test showed that *L. b* bacteria inhibit HT29 cells' proliferation, induce apoptosis in these cells, and inhibit *Rel A* gene proliferation by increasing *IKB* gene expression. Also, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and DNA ladder assay following the treatment of HT29 cells regarding the mentioned bacteria showed qualitative changes in cell apoptosis. In addition, real-time polymerase chain reaction (PCR) results showed that *L. b* increased *Casp3* gene expression in HT29 colon cancer cells (P=0.038).

Conclusion Our findings indicate that *L. b* stimulates the apoptotic cell signaling pathway in HT29 colon cancer cells. It can be used as a new treatment strategy or therapy for colon cancer treatment.

* Corresponding Author:

Changiz Ahmadizadeh, PhD.

Address: Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Tel: +98 (41) 44228211

E-mail: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

English Version

Introduction

In Iran, colon cancer is one of the most common cancers related to the digestive system. Regarding suffering from this cancer, Iranian men rank third, and women rank fourth [1]. In vitro experiments showed that probiotics play a role in suppressing primary neoplastic ulcer and colon cancer tumors [2]. The anticancer effects of probiotics are manifested by preventing the transformation of procarcinogens into carcinogens, binding and inactivating mitogenic compounds, reducing the growth of procarcinogenic bacteria (carcinogenic agents), reducing the absorption of mitogens, and increasing the function of the immune system [3]. Also, one of the functional mechanisms of probiotics, including lactobacilli, is the anti-proliferative property of cancer cells, including colon cancer, by inducing apoptosis [4].

Colon cancer often develops in the form of polyps on the surface of the inner wall of the intestine, which originates from the inner lining of the large intestine. These masses are usually non-cancerous, but if left untreated, they may become colon cancer [5]. Various factors, such as genetic, environmental, and dietary factors, can be considered the cause of colon cancer [6, 7]. It has been found that pro-neoplastic factors are present in the colon of people with colon cancer. Evidence has shown that probiotics can play a role in the prevention and relief of colon cancer symptoms [8].

Apoptosis induction in cancer cells depends on the activation of PTEN/Akt and NF- κ B signaling pathway subunits. The activation of the PTEN (tumor suppressor) gene in the PTEN/Akt signaling pathway and the *Rel A* gene in the NF- κ B pathway inhibits the proliferation of colorectal cancer cells, induces apoptosis, and induces M/G2 cell cycle arrest [9, 10].

NF- κ B pathway signaling (activation of *Rel A*, I κ B subunits) is involved in cell proliferation, inflammation, and apoptosis [11]. The activation of TLR4 signaling leads to the activation of MAPK and AKT pathways and, finally, the activation of NF- κ B (nuclear factor), transcription factors, and APL1 (activator protein) and control of the expression of pro-inflammatory cytokines and other genes related to immunity. TLR4 also activates IRF3 (interferon regulatory factor) and induces the expression of interferon (IFN β) and INF-responsive genes [12].

Probiotics are live and non-pathogenic microorganisms found in some foods that, when sufficient amounts of them enter the body, have a positive effect on the host's health. Types of lactic acid bacteria including *Lactobacillus* species, *Bifidobacterium* species, *Enterococcus faecium* species, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesantheroides*, *Pediococcus acid lactic*, and *Streptococcus thermophilus* are probiotic microorganisms. Lactobacilli and *Bifidobacterium* are among the most commonly used bacteria as probiotics, but some yeasts and other bacilli are also used [13].

The belief in the beneficial effects of probiotics is based on the fact that intestinal microbial flora plays a protective role against various diseases. Probiotics' main product is determined by stabilizing intestinal flora [14]. Parker defined probiotics as effective organisms that maintain intestinal microbial balance [15]. Probiotic means a product containing living and specific microorganisms with a sufficient number that colonization in a part of the body by creating a balance in the microbial flora and causing beneficial effects on the host's health [16].

Wagner et al. stated that *Lactobacillus roteri* bacteria might prevent colorectal cancer by reducing the expression of nuclear factor of NF- κ B (kappaB) dependent gene products [17]. The NF- κ B transcription factor is one of the crucial pathways with fast action and the first response factor to harmful cellular stimuli [18]. We aim to investigate the effect of isolated *Lactobacillus brevis* bacteria on expressing growth-related genes *Rel A*, I κ B, and *casp3* in HT29 colon cancer cells.

Materials and Methods

This experimental-laboratory study was conducted at Tabriz Medical Science Microtechnology Research Center in 2019. *L. b* strain (ATCC 13648) was prepared as good bacteria (probiotics) in the Bacteria Collection Center of the Iran Scientific Research Organization. Also, the HT29 cell line was designed from Pasteur's cell collection. Also, HT-29 human colon adenocarcinoma grade II cell line inside a flask containing 90 cc of RPMI1640 culture medium enriched with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 μ L of antibiotics (Penicillin 0.1 μ g/ μ L and streptomycin 0.1 μ g/ μ L) was cultured in an incubator at 37°C and 5% carbon dioxide. Then the cells were passaged according to the calculations related to the desired cell concentration (seed density) to perform the experiments. The required amount of the cell suspension was brought to the desired volume by the complete culture medium and was investigated with a microscope after checking the flask; then, they were incubated at 37°C [19].

The cultivation of *L. b* bacteria was also carried out in a nutrient-liquid culture medium. A total of 68 grams of the prepared medium powder was dissolved in one liter of distilled water. An autoclave machine sterilized the medium at 121°C for 20 minutes. To prepare bacterial supernatant, *L. b* bacteria were cultured in MRS liquid culture medium (De Man, Rogosa, and Sharpe agar) and kept in an incubator at 37°C for optimal culture.

Microculture tetrazolium (MTT) test

Measuring cell proliferation and survival using a fluorescent marker

The cytotoxic effect of *L. b* bacteria on the mentioned cancer cells was investigated by colorimetric method using tetrazolium dye (chemical name 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide) which is abbreviated as microculture tetrazolium (MTT). The MTT investigation aims to measure and reproduce using a fluorescent marker compared to the control group. First, an appropriate number of HT29 cells are cultured in each well (12,000 to 10,000 cells). After 24 h, the wells are controlled, and a proper amount of live thermophilus bacteria is added. Three different optical density (OD) types (0.5, 1, and 1.5) of bacteria are added.

The bar plates are incubated for 4 hours to affect the bacteria. The OD of bacteria is measured at a wavelength of 600 nm. The number of bacteria in OD1 is 8×10^9 cells per mL; for OD2, it is 1.6×10^9 cells per mL; for OD1.5, it is 1.2×10^9 cells per mL; for OD 5, it is 4×10^8 cells per mL. After each incubation, the well's medium is discarded, and each well is replaced with 200 μ L of fresh medium and 50 μ L of MTT solution (2 mg/mL dissolved in phosphate buffer solution preparation [PBS]). Cells not treated with bacteria were used as control. Then the plates were incubated for another 4 h at 37°C in the dark. After that, the MTT solution was replaced with 200 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) along with 25 μ L of Sorenson's buffer (0.1 M glycine, 0.1 M sodium chloride (NaCl) with pH 10.5 optimized with 1 M sodium hydroxide [NaOH]). Then the plates were shaken for 15 minutes at 37°C.

To determine the percentage of cell viability (viability test), at this stage, the cells are stained with trypan blue in such a way that 100 μ L of the solution containing the cells is taken from under the hood and poured into a 2cc tube, and 100 μ L trypan blue was added and mixed well. Then, cell counting was done using Neobar slides. The obtained average was multiplied by 100, and the dilution factor in getting the number of cells in one millimeter of solution. Optical absorbance was measured at 570 nm

with an ELISA reader. The percentage of cell survival in the negative control group was 100, and the rate of cells affected by different concentrations of bacteria was calculated by dividing the absorbance of the treated wells by the absorbance of the negative control multiplied by 100. A concentration of the tested compounds that reduces the percentage of cell life by half was considered an inhibitory concentration (IC50). This value was determined from the graph using Excel software [20].

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) cell staining

The purpose of DAPI staining is the effect of bacteria on the degeneration of the nucleus of cancer cells. To directly investigate the impact of *L. b* on HT29 cells, after treating all cells with the conditioning medium for 24 hours, the supernatant of the cell culture medium was completely emptied. They were fixed by adding 60 μ L of 4% paraformaldehyde to each well for 8 minutes. The cells inside each well were washed three times with 60 μ L of PBS. Then PBS was kept inside the wells for 5 minutes each time. Then the cells inside each well were permeabilized with 60 μ L of 0.1% Triton x-100 permeabilizing solution for 10 minutes, and then the cells were passaged. Then, 50 μ L of DAPI dye was to the cells inside each well and waited for 10 minutes, and it was washed 3 times again with PBS for 5 minutes. Then, 50 μ L of PBS was poured into each well, and the plates were placed in the refrigerator before taking pictures. Then the cells were evaluated with an Olympus IX81 inverted fluorescent microscope equipped with an Olympus DP70 camera (Olympus Corp., Tokyo, Japan) [21].

Extraction of ribonucleic acid (RNA) with Trizol

To extract ribonucleic acid (RNA), 500 μ L of Trizol was poured into each well of a 6-well plate and placed at room temperature for 20 minutes until the cells were completely lysed. Then, the contents of each 6-well container were transferred to 2 cc tubes, and about 200 μ L of chloroform was added to each tube. Then the tubes were centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes and transferred to new 2 cc tubes. Then, 2.5 times the sample volume of cold isopropanol was added to each tube and placed in a -70°C freezer for 24 h. Then the tubes were centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes, and the liquid on the tubes was poured out. Then the tubes were dried, and 20 μ L of diethyl pyrocarbonate (DEPC) was poured into each tube. Then OD and their concentration were measured in ng/mL with a nanodrop device. To check the quality of the extracted RNAs, 5 samples were randomly electrophoresed on a 2% agarose gel for 1 h at 80 V [22].

Complementary DNA (cDNA) synthesis

One µg of total RNA reverse transcribed with 0.2 µM universal hexamer primer. Then 1 µL (10 mM) of deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP) and DEPC water were mixed and incubated at 65°C for 5 minutes. Then put it on ice and add 5 units of reverse transcriptase (RT) (Moloney murine leukemia virus [MMLV]) enzyme, 1x buffer for Moloney murine leukemia virus (MMLV) RT (one unit per µL of ribonuclease [RNase] inhibitor), and at the end, the total volume of each tube was 20 µL. Then the tubes were placed in the thermocycler machine, and the program was given for 10 minutes at 25°C, 60 minutes at 42°C, and 10 minutes at 72°C to synthesize cDNAs.

Extraction of genomic DNA of *L. b* bacteria

The culture medium containing bacteria was transferred to 2 cc tubes and centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes. The supernatant of the tubes was poured out, and then 800 µL of lysis buffer containing sodium hydroxide and safety data sheet (SDS) was added to each tube. Then the tubes were placed in a Bain-Marie at 85°C for 30 minutes. In the next step, the tubes were placed in a freezer at -70°C for 10 minutes and then placed in a Bain-Marie at 85°C for 5-6 minutes. Then 700 µL of chloroform-isoamyl alcohol solution, containing 24 cc of chloroform and 1 cc of isoamyl alcohol, was added to each of the tubes, and in the next step, the tubes were centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes. Then, the supernatant of the tubes containing DNA was transferred to new 2 cc tubes, then 1.5 times the volume of cold isopropanol was added to the new tubes, and they were placed in a freezer at -70°C overnight.

Then, the samples were centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes, the supernatant was thrown out, and after drying, 50 µL of DNAs-free deionized distilled water was added to each tube.

Design primer

The primers used were designed by Oligo5 software and BLAST by the NCBI website. Tekapost synthesized the primers (Table 1).

Real-time PCR reaction (BIO-RAD iQ5, USA) was performed in 3 replicates and according to the temperature program (Table 2). They were poured into special real-time PCR tubes, 1 µL of cDNA and 19 µL of Cybergreen Mastermix containing 1 µL of forward primer (0.2 µM), 1 µL of reverse primer (0.2 µM), 7 µL of DEPC and 10 µL of Mastermix 1x real-time. Then the tubes were placed in the real-time PCR machine, and the machine was run. The GAPDH gene was considered an internal control gene.

Statistical analysis

Regarding the results obtained for the expression level of genes, first, the obtained CTs for each gene were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula. Then, the average (repeated three times) of the obtained results was calculated by SPSS statistical software in each group. Then, the normal distribution of the results was checked by the Shapiro-Wilks test. A one-way analysis of variance (ANOVA) statistical test was used in data analysis. The least significant difference (LSD) test was used to compare the groups?

Table 1. Primer sequences of target and reference genes

Primer Name (Accession No.)	Primer	PCR Product Size (bp)	Primer Tm
IKB -F	5'-AGCCCCAGTCTGTATCCTT -3'	85	59.46
IKB Universal reverse primer	5'-AGT TGA AGT TGC CGT CAG -3'		59.97
Casp3-F	5'-CATCACACCACCTGACCAA-3'	95	60.11
Casp3-R	5'-CTCAAATGCACCCGAGAAA-3'		59.89
REL A -F	5'-TCAATGGCTACACAGGACCAG-3'	95	60.26
REL A -R	5'-TCACACACTGGATTCCAGGT-3'		60.74
GAPDH-F	F: 5' -CGGTGGATCCCCTTATTG-3'	99	60.60
GAPDH-R	R: 5' -CTAACCAGGAATCCGATG-3'		59.30

PCR: Polymerase chain reaction.

Real-time reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR)

Internal Medicine Today

Table 2. Real-time polymerase chain reaction (PCR) program of studied genes

Number of Cycles	Steps	Temperature	Time
1	Initial separation	94°C	10 min
40	Separation	94°C	15 s
	Mating	59	30 s
	Elongation	72°C	25 s
1	Final elongation	72°C	5 min

Internal Medicine Today

mean. The tests were considered significant when the P value was less than 0.05. Then the expression ratio of each gene compared to the reference gene was calculated.

Results

Lactobacillus lethality on HT29 cell line

The number of cells required for the experiment was first optimized to investigate the lethal effect of *L. b* bacteria on HT29 cells. The mentioned cells were cultured in 10,000 cells per 96-well plate. Then these cells were incubated at 37°C. A day later, when the number of cells reached 20,000, i.e., 2 times, they were adjacent to increasing concentrations of bacteria. After 4 hours of being adjacent to the supernatant medium called conditioned media, they were filtered and added to new cells at different times. For each concentration of bacteria, 3 replications were considered, and 3 h were not treated with a conditioned environment as control. The results were obtained after 12, 24, and 48 h of treating the cells with a conditioned medium, *L. b*. Figure 1 and 2 shows the results of MTT.

HT29 cells were affected by different concentrations of *L. b* bacteria. During 48 hours of incubation of HT29 cells with *L. b* bacteria, a specific IC50 value was obtained with a concentration of $od=0.5$. Also, after the cells' treatment, DAPI staining was done on the cells to check the apoptosis. Figure 2 shows stained and unstained cells imaged by light and fluorescent microscopy.

The treated cells entered apoptosis and formed smaller nuclei than untreated cells with a bacterial conditioning medium. A: Normal light microscopic healthy cells (HT29 cells grow normally). B: Healthy cells without normal light microscopy (HT29 cells undergo apoptosis or death under the influence of *L. b* bacteria). C: DAPI-stained cells under the fluorescent microscope

and healthy without treatment with conditioned medium (shows the nucleus of HT29 cells, which are seen in blue with DAPI staining and without any change in a spherical shape). D: The nucleus of apoptotic cells stained with DAPI under a fluorescent microscope with fragmented nuclei (shows the nucleus of HT29 cells that are swollen and fragmented).

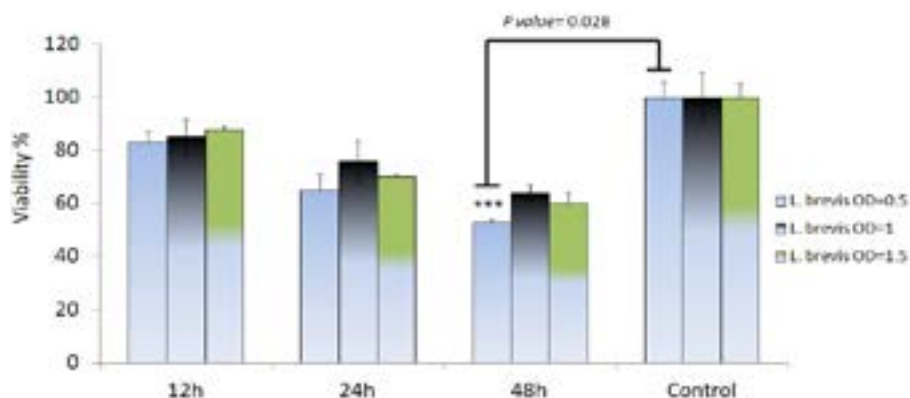
Polymerase chain reaction (PCR) for 16S rDNA gene of *L. b* bacteria

16S rDNA gene was used to confirm and determine the molecular identity of *L. b* by PCR. After PCR, the amplified fragment for the 16S rDNA gene is 1500 bp. After PCR, the product was electrophoresed in 2% agarose (Figure 3). A sharp band indicates specific amplification.

To perform this test, the cells were treated in 6-well plates with IC50 concentrations of the culture medium (condition) of *L. b* bacteria, and then the test was performed (Figure 4).

It shows that along with the increase in the concentration of cDNAs, the samples with higher concentrations in lower cycles have reached the threshold. Since all factors except the number of cDNAs in the samples are constant, it is clear that the obtained CTs depends only on the concentration of cDNAs, which indicates the correctness of the work $P=0.038$.

Figures 2, 3, and 4 show the expression level of *Rel A*, *IKB*, and *cas3* genes in the co-culture of HT29 colon cancer cells with *L. b* bacteria. They were treated individually for 12, 24, and 48 h and the number of changes in HT29 gene expression was measured by real-time PCR. All experiments were repeated three times, and $P<0.05$ was considered significant (***) (Figure 5).



Internal Medicine Today

Figure 1. Effect of the conditioned culture medium of *L. b* bacteria on cell viability after 12 h of incubation

The expression of the *Rel A* gene in the HT29 cell line was evaluated after different dosages and throughout 12 to 48 h. The results showed that *Rel A* gene expression has a significant relationship in the first 48 h.

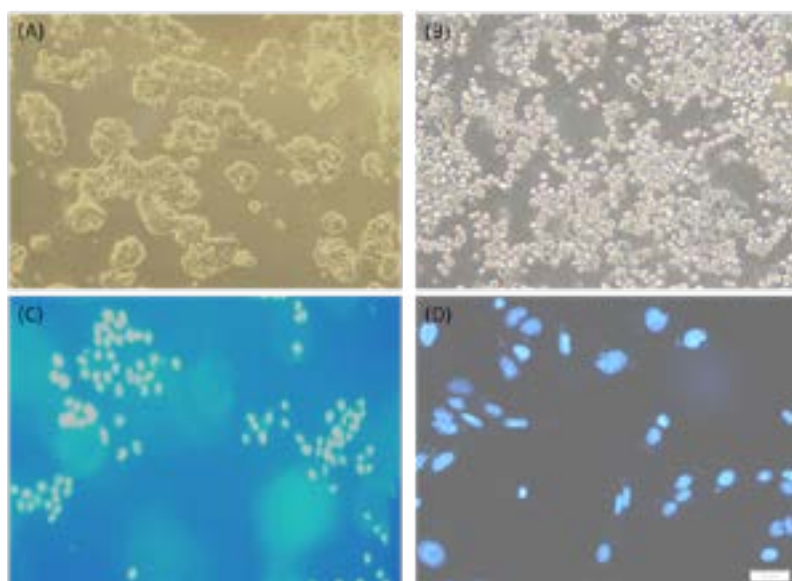
They were treated individually for 12, 24, and 48 h, and the number of changes in HT29 gene expression was measured by real-time PCR. All experiments were repeated three times, and $P < 0.05$ was considered significant (***) $P = 0.038$ (Figure 6).

The expression of the IKB gene in the HT29 cell line was evaluated after different dosage proximity and in 12, 24, and 48 h. The results showed that the expression of the IKB gene has a significant relationship in the first 48 h $P = 0.042$.

They were treated individually for 12, 24, and 48 h and the number of changes in HT29 gene expression was measured by real-time PCR. All experiments were repeated three times, and $P < 0.05$ was considered significant (Figure 7).

The expression of the *casp3* gene in the HT29 cell line was evaluated after different dosages and for 12 to 24 h. The results showed that *casp3* gene expression has a significant relationship in the first 48 h ($P = 0.038$).

They were treated individually for 12, 24, and 48 h and the number of changes in HT29 gene expression was measured by real-time PCR. All experiments were repeated three times, and $P < 0.05$ was considered significant, $P = 0.038$ (Figure 7).



Internal Medicine Today

Figure 2. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining of treated cells after 48 h of treatment with conditioning medium



Figure 3. DNA extracted from the bacterial sample on 1% agarose gel

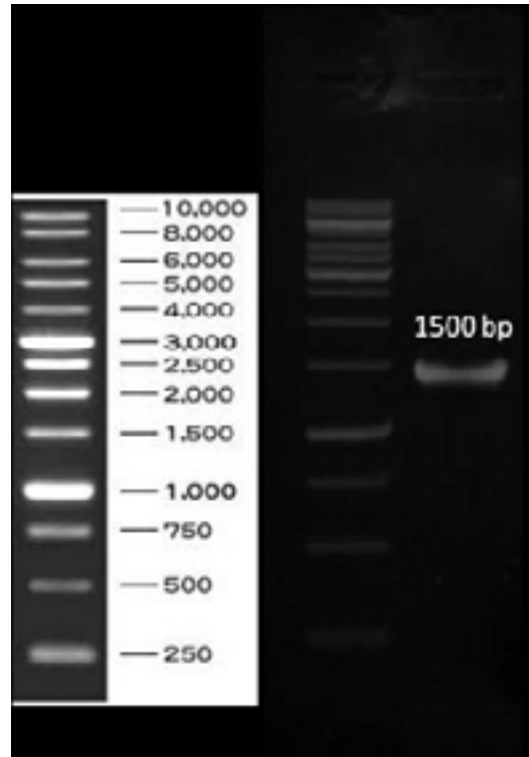


Figure 4. Agarose electrophoresis of the 16s rDNA gene of *L. b* bacteria

Real-time polymerase chain reaction (PCR) Results

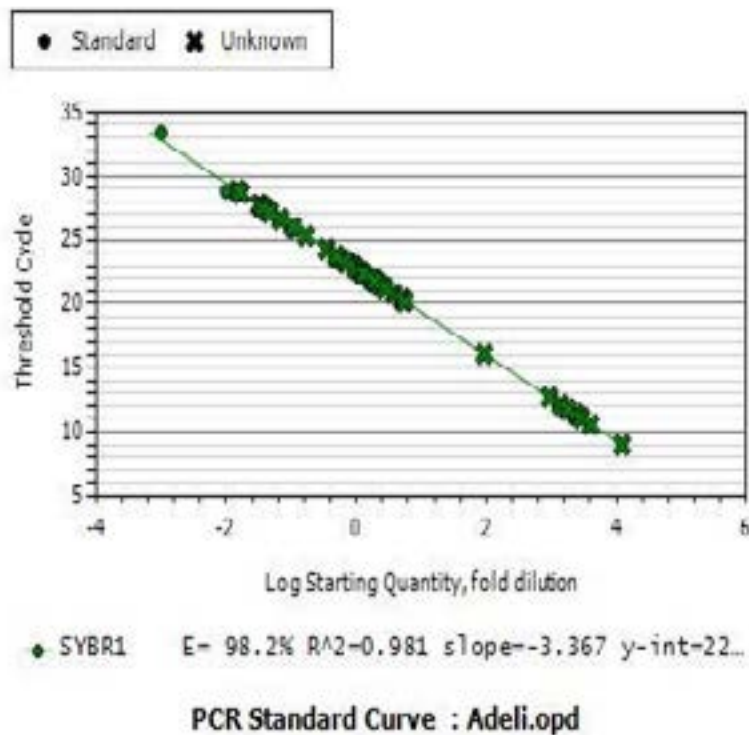


Figure 5. Polymerase chain reaction (PCR) standard curve

Internal Medicine Today

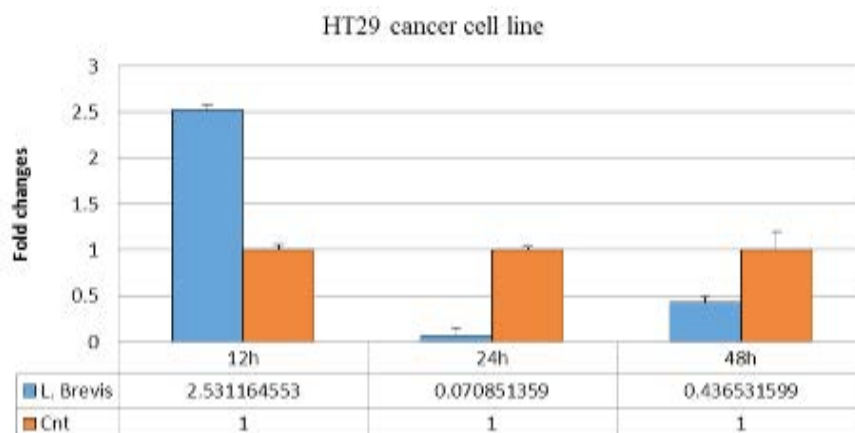


Figure 6. *Rel a* gene expression in HT29 cells under the influence of *L. b* bacteria

Internal Medicine Today

Discussion

Among all probiotics, Lactobacillus family bacteria, such as Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, and Lactobacillus delborki are among the vital components of the normal intestinal flora of humans and animals. In addition, the role of lactobacilli probiotics in facilitating the treatment of colorectal cancer is well known, which is consistent with our study [23, 24].

The current study evaluated the effect of *L. b* in preventing metastasis of colon cancer cells. The results of the MTT test showed that *L. b* inhibited the proliferation of HT29 cells and induced apoptosis in these cells, and inhibited the proliferation of the *Rel A* gene by increasing the expression of the IKB gene in these cells. The DAPI and DNA ladder assay results obtained from treating HT29 cells with the mentioned bacteria showed qualitative changes in cell apoptosis. In addition, real-time PCR

results showed that *L. b* bacteria increased Casp3 gene expression in HT29 colon cancer cells.

According to the studies of al. Choi et al. showed that heat-killed Lactobacilli, including Lactobacillus acidophilus, *L. b*, and Lactobacillus casei, decreased the viability of cancer cell lines. In the current study, *L. b* decreased the viability of the HT-29 cell line; therefore, Choi et al.'s study is consistent with our study [25].

According to the studies conducted by Taverniti et al., in Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei, Lactobacillus bulgaricus decreased the viability of HT-29 and Caco-2 cells. It is consistent with our study [26].

Kim et al. suggested that compounds derived from probiotic bacteria can inhibit several cancers. Proteome analysis found that several proteins are involved in autophagy

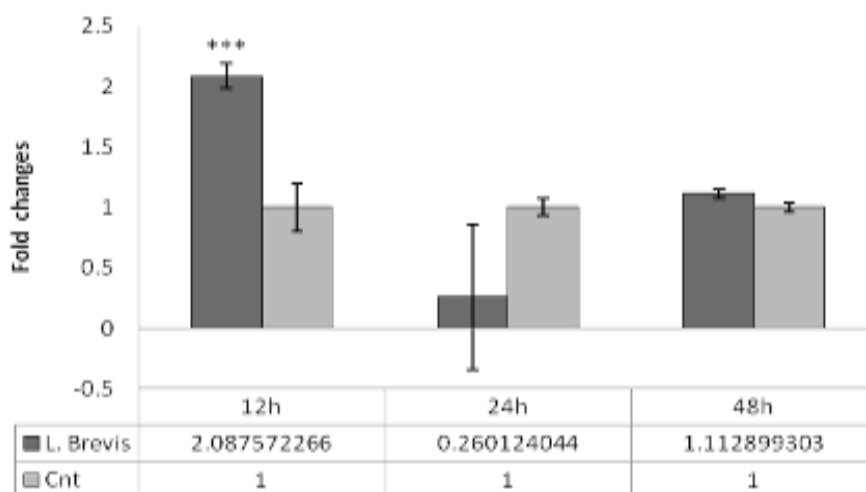
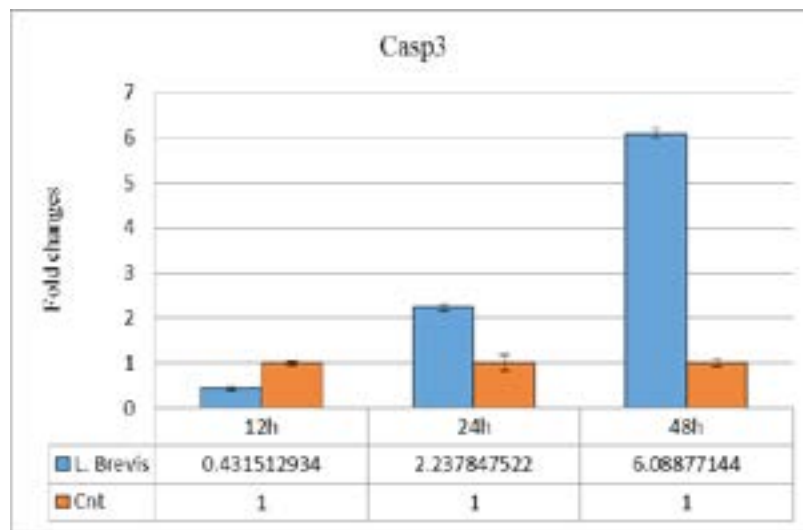


Figure 7. IKB gene expression in HT29 cells under the influence of *L. b* bacteria P=0.042

Internal Medicine Today



Internal Medicine Today

Figure 8. Level of Casp3 gene expression in HT29 cells under the influence of *L. b* bacteria

gy-mediated cell death, including GRP78 and Beclin-1, which are regulated by extracellular polysaccharides [27].

In a study, Salva et al. showed that probiotic lactobacilli also protected against cyclophosphamide-induced myelophosphamide suppression in animal models, leading to improved resistance to *Candida albicans*. As a result, probiotics have been proposed as a way to reduce immunosuppression in cancer patients [28].

Another study that confirms the current study was conducted by Sheng et al. They used *Lactobacillus plantarum* as a probiotic bacterium on HT29 cancer cells and introduced the PTEN pathway as the apoptosis pathway of cancer cells [29].

Chiu et al. also showed with their research that the soluble compounds secreted from *Lactobacillus casei* and *Rhamnosus* induce apoptosis in monocytic leukemia cells; as a result, probiotics can be considered a safe agent to fight cancer without any side effects, which is consistent with our study [30].

Liu & Pan also used ten native *Lactobacillus* strains in Taiwan and two lactic acid bacteria. They used cytoplasmic components and heat-killed bacteria on colon and breast cancer cell lines for their experiments. Their results showed that the inhibitory effect differs depending on the strain type, but the cells killed by heat decreased the viability percentage. In this study, *L. b* decreases the viability rate of the HT-29 cell line, which is consistent with our study [31].

Iyer et al. found that *Lactobacillus roteri* inhibited NF- κ B induced by TNF activity in a dose- and time-dependent manner [32].

Pan et al. analyzed the effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* bacteria on colorectal cancers in mice. The results indicated that *Lactobacillus acidophilus* reduced the severity of colorectal carcinogenesis and, on the other hand, increased programmed cell death in treated mice. In the current study, *L. b* also reduced colorectal carcinogens, which is consistent with our study [33].

In a study of clinical trials, Liu et al. showed the effect of probiotics in reducing infectious complications after surgery in colorectal cancer patients. Similarly, functional and quality-of-life health-related outcomes were significantly improved in patients undergoing resection for colorectal cancer treated with *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis* [34].

By investigating the effect of *L. b* on improving gastric gastritis caused by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model, Orcid et al. showed that in infected groups, after treatment with *L. b*, inflammation was reduced and recovery was achieved. The rate of *Helicobacter pylori* infection eradicated in the treatment group showed a decrease in inflammation after tissue examination. In the current study, *L. b* reduces colorectal carcinogens and HT-29 cell line; therefore, the results of their study are consistent with our study [35].

Conclusion

Our findings show that *L. b* stimulates the cell signaling pathway of apoptosis in HT29 colon cancer cells and can be used as a new therapeutic strategy or adjuvant therapy for the treatment of colon cancer.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The Ethics Committee of the [Ahar Branch, Islamic Azad University](#) has approved this study (Code: 22030507971002).

Funding

This article is extracted from the MSc. thesis of Hojjat Adeli in the Department of Microbiology, [Ahar Branch, Islamic Azad University](#).

Authors' contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We express our gratitude to all those who helped us with this research.

This Page Intentionally Left Blank



مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس برویس بر میزان بیان ژن های IKB، Rel A و Casp3 در سلول های سرطانی کولون

حجت عادل^۱، *چنگیز احمدی زاده^۱، محمدحسین صادقی زالی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Adeli H, Ahmadizadeh CH, Sadeghi Zali MH. [Investigation of the Effect of *Lactobacillus brevis* Bacteria on the Expression of Rel A, IKB, and casp3 Genes in HT29 Colon Cancer Cells (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(3):330-353. <https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3277.3>

<https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3277.3>

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۳ اسفند ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۴ اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۱

اهداف مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیک شروع و پیشرفت عوامل سرطان را از طریق مسیرهای مختلف مهار می‌کنند. هدف ما بررسی تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس برویس جداسازی شده بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد IKB, Rel A, و Casp3 در سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌باشد.

مواد و روش‌ها در طول این مطالعه ابتدا باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیل گونه برویس کشت داده شدند و پس از تهیه کاندیشن مدیا بر روی سلول‌های سرطان HT29 تیمار شدند. اثر سمیت سلولی باکتری با استفاده از روش MTT assay (Microculture Tetrazo-ium Test) مورد بررسی قرار گرفت. با استخراج DNA از سلول‌های تیمار شده انجام شد و تست DNA Ladder assay صورت گرفت همچنین تست DAPI برای نشان دادن آپتوز سلولی انجام شد. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA برای تعیین مکانیسم تأثیر این باکتری بر سیگنالینگ سلولی، بیان ژن‌های مرتبط با رشد Cas3 (Rel A, IKB) به روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس تکثیر سلول‌های HT29 را مهار کرده و سبب القای آپتوز در این سلول‌ها می‌شوند و تکثیر ژن Rel A را از طریق افزایش بیان ژن IKB در این سلول‌ها مهار می‌کنند. نتایج دیپ و DNA ladder assay حاصل از تیمار سلول‌های HT29 با باکتری‌های ذکر شده، تغییرات کیفی آپتوز سلولی را نشان داد. علاوه بر این، نتایج Real-time PCR نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس سبب افزایش بیان ژن casp3 در سلول‌های سرطانی کولون HT29 شد ($P=0/028$).

نتیجه‌گیری یافته‌های ما نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس برویس مسیر سیگنالینگ سلولی آپتوز در سلول‌های سرطانی کولون HT29 را تحریک کرده و می‌توان درجهت استراتژی جدید درمانی و یا اجوانت تراپی برای تیمار سرطان کولون استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها:

سرطان کولون، باکتری لاکتوباسیلوس برویس، بیان ژن

* نویسنده مسئول:

دکتر چنگیز احمدی زاده

نشانی: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه میکروبیولوژی.

تلفن: ۴۴۲۲۸۲۱۱ (۴۱) +۹۸

پست الکترونیکی: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

مقدمه

لاکتیس، لوکونوستوک مزانتروئیدس، پدیوکوکوس اسیدیلکتی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس از میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک می‌باشند. لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم از متداول‌ترین باکتری‌های مورد استفاده به‌عنوان پروبیوتیک می‌باشد؛ اما بعضی از مخمرها و دیگر باسیل‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۳].

باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت‌کننده در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد؛ اثر اصلی پروبیوتیک‌ها با تثبیت فلور میکروبی روده مشخص می‌شود [۱۴]. پارکر پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان ارگانسیم‌هایی که در برقراری تعادل میکروبی روده مؤثر هستند، تعریف کرد [۱۵]. واژه پروبیوتیک به‌معنای محصولی حاوی میکروارگانسیم‌های زنده و مشخص با تعدادی کافی می‌باشد که به‌وسیله کولونیزاسیون در بخشی از بدن از طریق ایجاد تعادل در فلور میکروبی باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی می‌زبان می‌شود [۱۶]. واگنر و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که باکتری‌های لاکتوباسیلوس روتری ممکن است سرطان کلورکتال را از طریق کاهش بیان محصولات ژنی وابسته به فاکتور هسته‌ای NF- κ B (kappaB) پیشگیری کند [۱۷]. فاکتور رونویسی NF- κ B، یکی از مهم‌ترین مسیرهای دارای عمل سریع و اولین عامل پاسخگو به محرک‌های سلولی مضر می‌باشد [۱۸]. هدف ما بررسی تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس برویس جداسازی‌شده بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد Rel A, IKB و Casp3 در سلول‌های سرطانی کولون HT29 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که از نوع تجربی آزمایشگاهی می‌باشد، و در مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۹۸ انجام شده است. سویه باکتری لاکتوباسیلوس برویس (ATCC ۱۳۶۴۸) به‌عنوان باکتری‌های مفید (پروبیوتیک) از مرکز کلکسیون باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و رده سلولی HT29 از کلکسیون سلول انیستوی پاستور تعیین شد. رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 hu- man colon adenocarcinoma grade II در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI1640 غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) (FBS)، ۱۰۰ μ g/ μ L strepto- penicillin and ۰,۱ μ g/ μ L mycin در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس سلول‌ها پاساژ داده شد. باتوجه‌به محاسبات مربوط به غلظت مناسب سلولی مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانده شد و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر توسط میکروسکوپ،

یکی از شایع‌ترین انواع سرطان دستگاه گوارش در ایران، سرطان روده بزرگ است که از نظر بروز در مردان ایرانی رتبه سوم و در زنان رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است [۱]. در آزمایشات برون‌تنی نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها در سرکوب زخم اولیه نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ نقش دارند [۲]. اثرات ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژن (عوامل سرطان‌زا)، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد [۳]. همچنین یکی از مکانسیم‌های عملکردی پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها خاصیت ضدتکثیر سلول‌های سرطانی، از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است [۴]. سرطان کولون اغلب به شکل پولیپ در سطح جداره داخلی روده ایجاد می‌شود که منشأ آن پوشش داخلی روده بزرگ است. این توده‌ها معمولاً غیرسرطانی هستند، ولی اگر درمان نشوند ممکن است به سرطان کولون تبدیل شوند [۵].

عوامل مختلف مثل عوامل ژنتیکی، محیطی، و رژیم غذایی می‌توانند به‌عنوان عامل سرطان روده بزرگ در نظر گرفته شوند [۶، ۷]. نشان داده شده است که عوامل پیش‌نئوپلاستیک در کولون افراد مبتلا به سرطان کولون وجود دارند. شواهد نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌عنوان عوامل پیشگیری و تسکین علائم سرطان کولون نقش داشته باشند [۸]. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی وابسته به فعال شدن زیرواحدهای مسیره‌های پیام‌رسانی PTEN/Akt و NF- κ B می‌باشد. فعال شدن ژن PTEN (مهارکننده تومور) در مسیر سیگنالینگ PTEN/Akt و ژن Rel A در مسیر NF- κ B، باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی کولورکتال، القای آپوپتوز، القای توقف M/G2 چرخه سلولی می‌شود [۹، ۱۰]. پیام‌رسانی مسیر NF- κ B (فعال شدن زیرواحدهای IKB,RelA) در تکثیر سلولی، التهاب و آپوپتوز، نقش دارد [۱۱]. از فعال شدن سیگنالینگ TLR4 منجر به فعال شدن مسیره‌های MAPK, AKT و در نهایت فعال شدن NF- κ B nuclear factor (transcription factor) (NF- κ B) و APL1 (activator protein) و APL1 (activator protein) و کنترل بیان سایتوکاین‌های پیش‌تهابی و دیگر ژن‌های در ارتباط با ایمنی می‌شود. سیگنالینگ TLR4 همچنین سبب فعال شدن IRF3 (interferon regulatory factor) و القای بیان ژن‌های Iinter-feron responsive and feon (INF-responsive) می‌شود [۱۲]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده و غیربیماری‌زای موجود در بعضی مواد غذایی هستند که وقتی مقادیر کافی از آنها وارد بدن شوند، تأثیر مثبتی بر سلامت می‌زبان می‌گذارند، انواع باکتری‌های اسید لاکتیک شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس، گونه‌های بیفیدوباکتریوم، گونه‌های انتروکوکوس فیشیوم، لاکتوکوکوس

1. Seedind density

با تریپان بلو رنگ آمیزی شده، به این شکل که ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول حاوی سلول‌ها را از زیر هود برداشته و داخل تیوب ۲ سی‌سی ریخته شد و ۱۰۰ ماکرولیتر تریپان بلو افزوده و به خوبی مخلوط شد. بعد با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد. میانگین به‌دست آمده را ضرب‌در ۱۰۰ و ضرب رقت کرده که تعداد سلول‌ها در یک میلی‌متر محلول به‌دست آمد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر سنجیده شد. درصد بقای سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور و درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفته بودند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به‌عنوان IC ۵۰ در نظر گرفته شد. این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم‌افزار اکسل تعیین شد [۲۰].

رنگ آمیزی سلولی دپی^۲

هدف از رنگ آمیزی دپی، تأثیر باکتری بر روی تحلیل رفتن هسته سلول‌های سرطانی می‌باشد. برای بررسی مستقیم اثر لاکتوباسیلوس برویس بر سلول‌های HT29، بعد از تیمار همه سلول‌ها با محیط کاندیشن به‌مدت ۲۴ ساعت مایع رویینی محیط کشت سلول‌ها را کاملاً خالی شد و با افزودن ۶۰ ماکرولیتر پارافارمالدهید ۴ درصد به هر چاهک به‌مدت ۸ دقیقه فیکس شدند. سلول‌های داخل هر چاهک را با ۶۰ ماکرولیتر (Phos-) (phate Buffer Solution Preparation)

PBS ۳ بار شست‌وشو داده شد و هر بار ۵ دقیقه PBS را در داخل چاهک‌ها نگه داشته شد. سپس سلول‌های داخل هر چاهک با ۶۰ ماکرولیتر محلول نفوذپذیرکننده Triton X ۱۰۰-تریون ایکس ۱۰۰، ۱٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شدند؛ سپس سلول‌ها پاساژ داده شدند. بعد به سلول‌های داخل هر چاهک ۵۰ ماکرولیتر رنگ (DAPI^۴, 6-diamidino-2-phenylindole) را ریخته و به‌مدت ۱۰ دقیقه صبر کرده، و دوباره ۳ بار با PBS به‌مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شد و بعد داخل هر چاهک ۵۰ ماکرولیتر PBS ریخته و پلیت‌ها تا قبل از عکس‌برداری، داخل یخچال قرار داده شدند. سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانت Olympus IX81 invert مجهز به-Olym (pus DP70 camera Olympus Corp., Tokyo, Japan) ارزیابی قرار گرفتند [۲۱].

استخراج RNA با تریزول

برای استخراج RNA به سلول‌های تیمار شده با باکتری در هر چاهک پلیت ۶ خانه، ۵۰۰ ماکرولیتر تریزول ریخته و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند؛ سپس محتویات هر چاهک پلیت ۶ خانه را به تیوب‌های ۲ سی‌سی

مورد بررسی قرار گرفت سپس در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند [۱۹]. کشت باکتری لاکتوباسیلوس نیز در محیط کشت مایع نوترینت انجام شد مقدار ۶۸ گرم از پودر آماده محیط را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و سپس محیط موردنظر را توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل کردیم. برای تهیه سوپرناتانت باکتری‌ها، باکتری‌های *Lactobacillus brevis i* (در محیط کشت مایع MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) کشت داده شدند و جهت کشت بهینه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تست MTT Microculture Tetrazolium Test

(سنجش تکثیر و بقای سلول با استفاده از نشان‌گر فلورسنت)

اثر سمیت سلولی باکتری لاکتوباسیلوس برویس بر روی سلول‌های سرطانی ذکر شده با روش رنگ‌سنجی، با استفاده از رنگ تترازیلیوم با نام شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide که اختصاراً MTT نامیده می‌شود. هدف از بررسی MTT سنجش و تکثیر با استفاده از نشانگر فلورسنت می‌باشد که در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. ابتدا تعداد مناسبی از سلول‌هایی HT29 در هر یک از چاهک‌ها کشت داده می‌شوند (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده و مقدار مناسبی از باکتری ترموفیلوس زنده به چاهک‌ها افزوده می‌شود به چاهک‌ها ۳ نوع OD مختلف باکتری افزوده می‌شود ۱/۵، ۱/۵ بارپلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت جهت تأثیر باکتری‌ها انکوبه می‌شوند. OD باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است، میزان باکتری در OD1 برابر است با ۸×۱۰^۹ سلول در هر میلی‌لیتر است. این میزان برای OD2 برابر است با ۱/۶×۱۰^۹ سلول در هر میلی‌لیتر، برای OD1. ۵ برابر است با ۱/۲×۱۰^۹ سلول در هر میلی‌لیتر و برای OD. ۵ می‌شود ۲×۱۰^۸ سلول در هر میلی‌لیتر. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل‌شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول تیمار نشده با باکتری به‌عنوان کنترل به‌کار برده شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر ((Dimethyl sulfoxide) DMSO به‌همراه ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (گلایسین M ۰/۱، NaCl M ۰/۱، دارای H ۱۰/۵ بهینه شده با NaOH M ۰/۱) جایگزین شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک شدند.

برای تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها در این مرحله سلول‌ها

3. Dapi staining

2. Viability test

استخراج DNA ی ژنومی باکتری لاکتوباسیلوس برویس

محیط کشت حاوی باکتری‌ها را به تیوب‌های ۲ سی‌سی منتقل و با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی تیوب‌ها را بیرون ریخته، سپس ۸۰۰ ماکرولیتزر لیزبافر حاوی هیدروکسیدسدیم و SDS می‌باشد، به هرکدام از تیوب‌ها افزوده شد؛ سپس تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد، تیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر -۷۰ درجه قرار داده و دوباره به مدت ۵ تا ۶ دقیقه در بن‌ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد ۷۰۰ ماکرولیتزر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل، حاوی ۲۴ سی‌سی کلروفرم و ۱ سی‌سی ایزوامیل الکل به هرکدام از تیوب‌ها اضافه شد و در مرحله بعد تیوب‌ها با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی تیوب‌ها که حاوی DNA است به تیوب‌های ۲ سی‌سی جدید منتقل شده، بعد یک و نیم برابر حجم نمونه‌ها ایزوپروپانل سرد به تیوب‌های جدید افزوده شد و به مدت یک شبانه روز در فریزر -۷۰ درجه قرار داده شدند. نمونه‌ها با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی را بیرون ریخته و پس از خشک شدن ۵۰ ماکرولیتزر آب مقطر دیونیزه DNase free به هرکدام از تیوب‌ها افزوده شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار Oligo5 طراحی و توسط وبسایت بلاست^۴ و مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری^۵ شدند. پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند (جدول شماره ۱).

4. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
5. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

نام آغازگر (شماره دسترسی)	توالی آغازگر	اندازه محصول PCR (bp)	Tm آغازگر
IKB-F	5'-AGCCCCAGTCTGTATCCTT-3'	۸۵	۵۹/۴۶
IKB Universal reverse primer	5'-AGT TGA AGT TGC CGT CAG-3'		۵۹/۹۷
Casp3-F	5'-CATCACACCACCTGACCAA-3'	۹۵	۶۰/۱۱
Casp3-R	5'-CTCAAATGCACCCGAGAAA-3'		۵۹/۸۹
Rel A-F	5'-TCAATGGCTACACAGGACCAG-3'	۹۵	۶۰/۲۶
Rel A-R	5'-TCACACACTGGATTCCCAGGT-3'		۶۰/۷۴
GAPDH-F	F: 5'-CGGTGGATCCCCTTTATTG-3'	۹۹	۶۰/۶۰
GAPDH-R	R: 5'-CTAACAGGAATTCGGATG-3'		۵۹/۲۰

جدول ۲. برنامه PCR time Real زن‌های مورد مطالعه

تعداد سیکل	گام	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۱	جد شدن اولیه	۹۴	۱۰
	جدا شدن	۹۴	۱۵
۴۰	جفت شدن	۵۹	۳۰
	طولیل شدن	۷۲	۲۵
۱	طولیل شدن نهایی	۷۲	۵

طب داخلی روز

نتایج توسط آزمون شاپیرو ویلک^۶ بررسی شد. برای تجزیه داده‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه^۷ استفاده شد. برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنادار^۸ استفاده شد. آزمون‌ها زمانی معنادار در نظر گرفته شدند که مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بود. سپس نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن رفرنس محاسبه شد.

یافته‌ها

کشدگی لاکتوباسیل بر روی رده سلولی HT29

به‌منظور بررسی اثر کشدگی باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس بر روی سلول‌های HT29، ابتدا تعداد سلول‌های مورد نیاز جهت آزمایش بهینه‌سازی شدند. سلول‌های مذکور به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس این سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. سلول‌ها یک روز بعد که مقدارشان ۲۰ هزار عدد شد؛ یعنی زمانی که

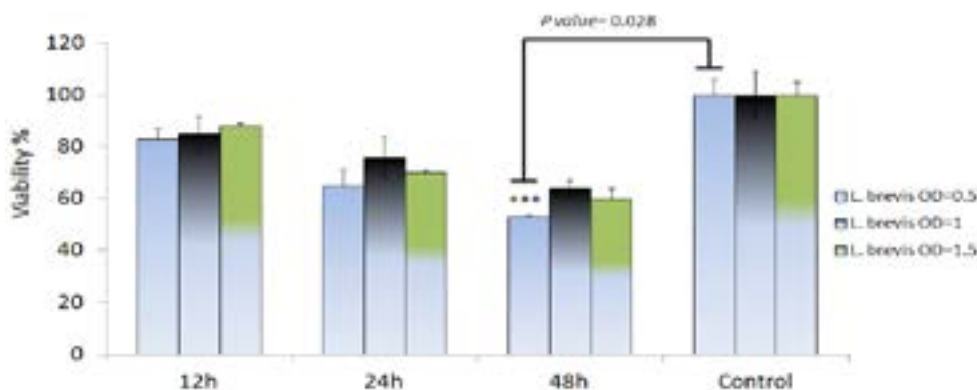
6. Shapiro Wilks
7. One-way ANOVA
8. Least Significant Difference (LSD)

Real-time RT-PCR

واکنش Real time PCR (BIO-RAD iQ5, USA) به صورت تکرارهای ۳ تایی و طبق برنامه دمایی که اطلاعات آن در جدول شماره ۲ موجود است صورت گرفت. بدین شکل که در تیوب‌های مخصوص Real time PCR ۱ ماکرولیت cDNA و ۱۹ ماکرولیت مسترمیکس سایبرگرین حاوی ۱ ماکرولیت پرایمر فوروارد (۰/۲ ماکرو مولار)، ۱ ماکرولیت پرایمر ریورز (۰/۲ ماکرو مولار)، ۷ ماکرولیت DEPC و ۱۰ ماکرولیت Mastermix 1x Real time PCR ریخته شد. بعد تیوب‌ها را در دستگاه Real time PCR قرار داده و دستگاه run شد و از ژن GAPDH به‌عنوان زن کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

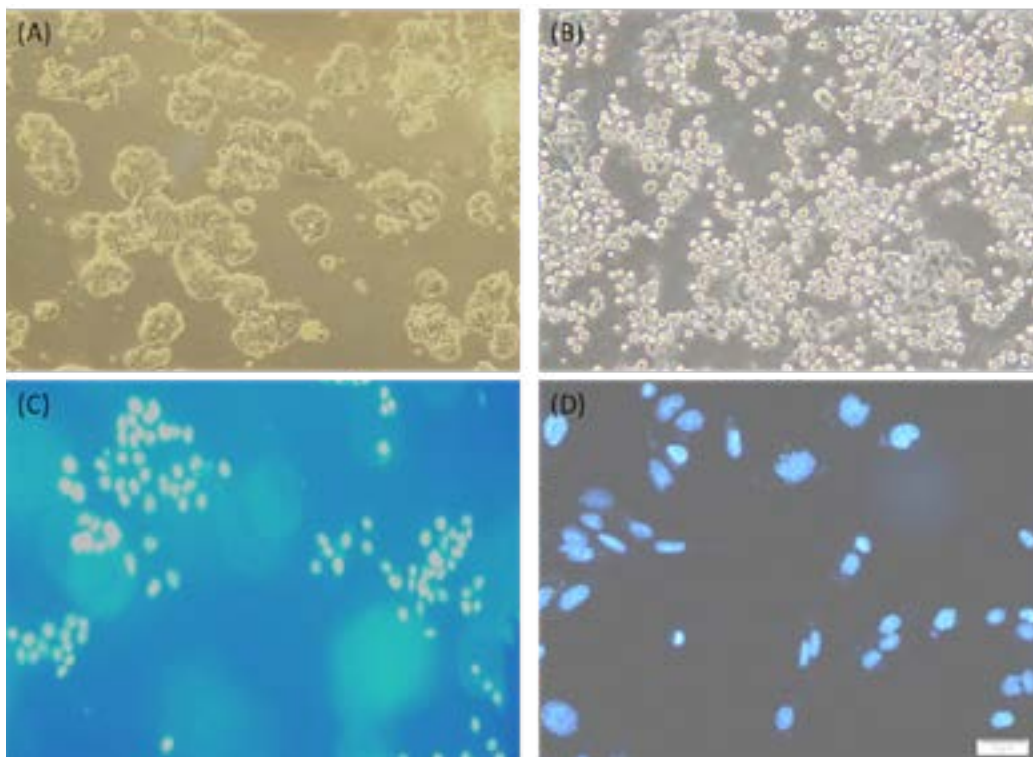
تحلیل آماری داده‌ها

در مورد نتایج به‌دست آمده برای میزان بیان ژن‌ها، ابتدا CT‌های به‌دست آمده برای هر ژن توسط فرمول 2-DDCT محاسبه شد. سپس، میانگین (سه بار تکرار) نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد؛ سپس توزیع نرمال بودن



طب داخلی روز

تصویر ۱. اثر محیط کشت کاندیشن باکتری لاکتوباسیلوس برویس بر روی حیات سلولی پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون.



طب داخلی روز

تصویر ۲. رنگ آمیزی سلول‌های تیمار شده با رنگ dapi، پس از ۴۸ ساعت تیمار با محیط کاندیشن.

HT29 به صورت نرمال رشد می‌کنند. C: سلول‌های رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت و سالم بدون تیمار با محیط کاندیشن (هسته سلول‌های HT29 را نشان می‌دهد که با رنگ آمیزی دپی به صورت آبی و بدون هیچ تغییری به صورت کروی دیده می‌شوند). B: سلول‌های سالم بدون زیر میکروسکوپ نوری معمولی (سلول‌های HT29 تحت تأثیر باکتری لاکتوباسیلوس برویس به سمت آپوپتوز یا از بین رفتن می‌روند). D: هسته سلول‌های آپوپتوز شده و رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت که هسته‌های قطعه‌قطعه شده دارند (هسته سلول‌های HT29 را نشان می‌دهد که به صورت متورم و تکه‌تکه شده می‌باشند).

انجام واکنش زنجیره‌ای PCR برای ژن 16S rdna باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویسژن 16S rdna برای تأیید و تعیین هویت مولکولی باکتری لاکتوباسیلوس برویس به روش PCR مورد استفاده د. پس از انجام PCR قطعه تکثیری برای ژن 16S rdna ، ۱۵۰۰ جفت باز آورد شده است. پس از انجام پی سی آر، محصول PCR در آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و نتیجه الکتروفورز در تصاویر شماره ۳، ۴ و ۵ آورده شده است.

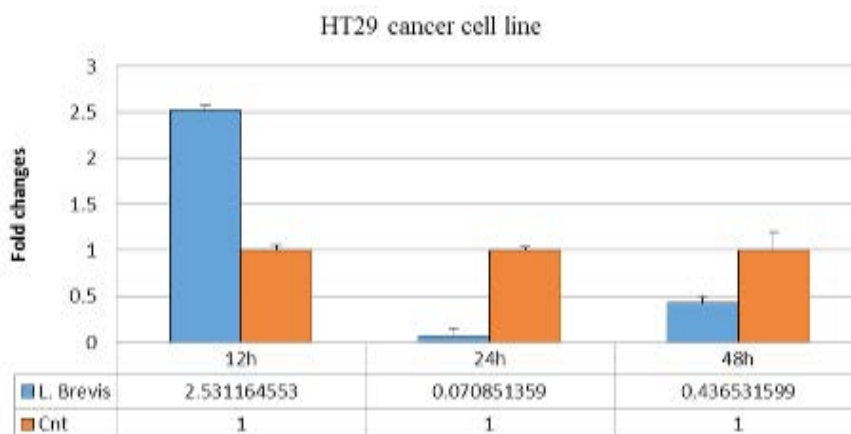
همان‌طور که مشاهده می‌شود باند شارپ نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی می‌باشد.

۲ برابر شدند، با غلظت‌های افزایشی باکتری‌ها هم‌جوار شده و پس از ۴ ساعت هم‌جواری محیط رویی به نام کاندیشن مدیا فیلتر شده و به سلول‌های جدید در ساعت‌های مختلف اضافه شدند. برای هر غلظت باکتری ۳ تکرار در نظر گرفته شد و ۳ خانه به عنوان کنترل با محیط کاندیشن تیمار نشدند. بعد از ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با محیط فیلتر شده کاندیشن لاکتوباسیلوس برویس نتایج به دست آمد. نتایج حاصل از MTT در تصویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند.

سلول‌های HT29 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری لاکتوباسیلوس برویس قرار گرفتند. شایان ذکر است طی مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدن سلول‌های HT29 با باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس میزان IC50 مشخصی با غلظت حاصل شد. $od=0,5$

همچنین طبق روش ذکر شده در بخش روش بررسی پس از تیمار سلول‌ها به منظور بررسی آپوپتوز، بر روی سلول‌ها رنگ آمیزی DAPI انجام شد. تصویر شماره ۱ سلول‌های رنگ شده و رنگ نشده توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت تصویربرداری شده را نشان می‌دهد.

همان‌طور که نشان داده شده است سلول‌های مورد تیمار در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار با محیط کاندیشن باکتری وارد آپوپتوز شده و هسته‌های ریزتری را تشکیل داده‌اند. A: سلول‌های سالم با میکروسکوپ نوری معمولی (سلول‌های



طب داخلی روز

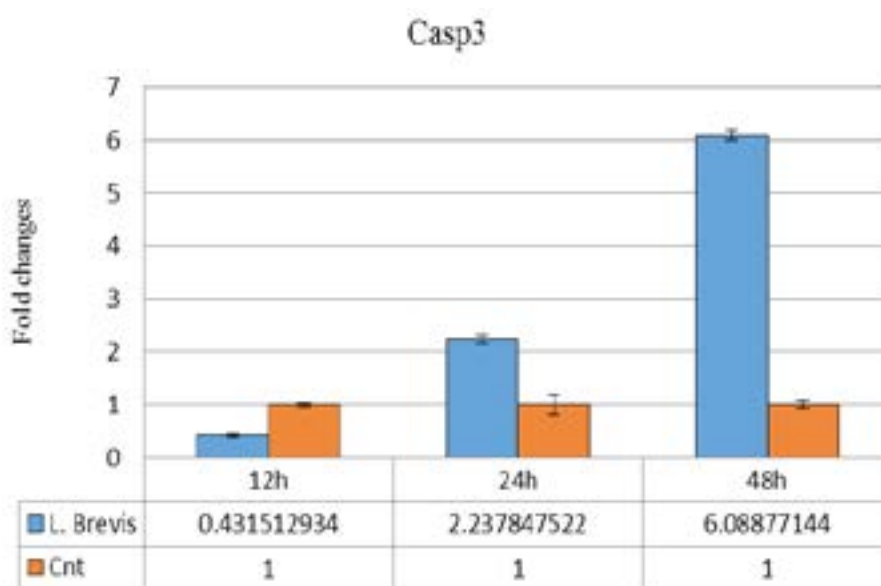
تصویر ۶ میزان بیان ژن A Rel در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های لاکتوباسیلوس برویس

PCR time مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شد و $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۷).

بیان ژن casp3 در رده سلولی HT29 پس از مجاورت های دوزهای مختلف و در بازه زمانی ۱۲ الی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد بیان ژن casp3 در ۴۸ ساعت اول رابطه معناداری پیدا می کند ($P = 0.038$). به صورت تکی به مدت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شد و $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد ($P = 0.038$) (تصویر شماره ۸).

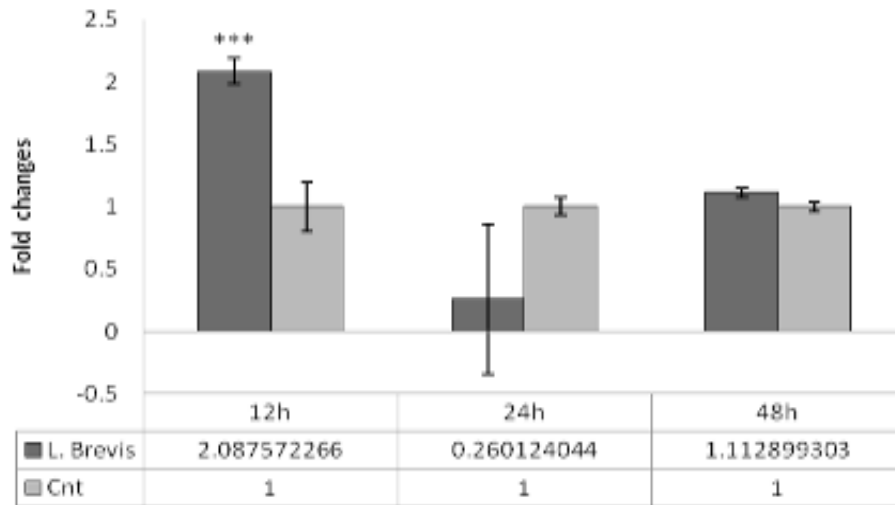
(***) در نظر گرفته شد. بیان ژن Rel A در رده سلولی HT29 پس از مجاورت های دوزهای مختلف و در بازه زمانی ۱۲ الی ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد بیان ژن Rel A در ۴۸ ساعت اول رابطه معناداری دارد (تصویر شماره ۶).

به صورت تکی به مدت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایشات ۳ بار تکرار شد و $P < 0.05$ معنادار (***) در نظر گرفته شد. $P = 0.038$ بیان ژن IKB در رده سلولی HT29 پس از مجاورت های دوزهای مختلف و در بازه زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد بیان ژن IKB در ۴۸ ساعت اول رابطه معناداری پیدا می کند $P = 0.042$ به صورت تکی به مدت ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن HT29 به روش Real



طب داخلی روز

تصویر ۷. میزان بیان ژن casp3 در سلول های HT29 تحت تاثیر باکتری های لاکتوباسیلوس برویس



تصویر ۸. میزان بیان ژن IKB در سلول های HT29 تحت تأثیر باکتری های لاکتوباسیلوس برویس P=۰/۰۴۲

طب داخلی روز

بحث

سبب کاهش درصد زیستایی سلولهای HT-29 و ۲-Caco شدند که در مطالعه حاضر لاکتوباسیلوس برویس هم سبب کاهش درصد زیستایی سلولهای HT-29 شد؛ بنابراین مطالعه تاورنیتی و همکاران با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۲۶]. کیم و همکارانش در سال ۲۰۱۰، پیشنهاد دادند که ترکیبات به‌دست آمده از باکتری‌های پروبیوتیک توانایی مهار تعدادی از سرطان‌ها را دارند. آن‌ها براساس تجزیه پروتئوم دریافتند که چندین پروتئین در مرگ سلولی به طریق اتوفاز دخالت دارند که شامل: GRP78 و Beclin-1 می‌باشند که توسط پلی ساکاریدهای خارج سلولی تنظیم می‌شوند [۲۷]. سلوا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای نشان دادند که لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک نیز در برابر سرکوب میلو-فسفامید ناشی از سیکلوفسفامید در مدل‌های حیوانی محافظت می‌کنند که منجر به بهبود مقاومت به کاندیدا آلبیکنس شده است. در نتیجه، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان روشی برای کاهش سرکوب سیستم ایمنی در بیماران سرطانی پیشنهاد شده‌اند [۲۸]. همچنین مطالعه دیگری که مطالعه حاضر را تأیید می‌کند توسط شنگ و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شده است. آن‌ها لاکتوباسیل پلانتروم را به‌عنوان باکتری پروبیوتیک بر روی سلول‌های سرطانی HT29 استفاده و مسیر PTEN را به‌عنوان مسیر آپوپتوز سلول‌های سرطانی معرفی کردند [۲۹]. چپو و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز با تحقیقات خود نشان دادند که ترکیبات محلول ترشح شده از لاکتوباسیلوس کازئی و رامنوسوس باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های لوکمیا مونوسیتی می‌شوند، در نتیجه می‌توان پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان عاملی ایمن برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ‌گونه عارضه جانبی در پی ندارند که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۳۰]. ليو و پان نیز در سال ۲۰۱۰ ده سویه بومی لاکتوباسیلوس در تایوان و دو باکتری اسید لاکتیک را مورد استفاده قرار دادند. آن‌ها از اجزاء سیتوپلاسم و باکتری کشته شده توسط حرارت

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. علاوه بر این نقش پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی بر تسهیل درمان سرطان کولورکتال به‌خوبی شناخته شده است که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۲۳، ۲۴]. در تحقیق حاضر، اثر لاکتوباسیلوس برویس در جلوگیری از متاستاز سلول‌های سرطانی کولون ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس تکثیر سلول‌های HT29 را مهار کرده و سبب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شوند و تکثیر ژن Rel A را از طریق افزایش بیان ژن IKB در این سلول‌ها مهار می‌کنند. نتایج دیپی و DNA ladder assay حاصل از تیمار سلول‌های HT29 با باکتری‌های ذکر شده، تغییرات کیفی آپوپتوز سلولی را نشان داد. علاوه بر این نتایج Real-time PCR نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس سبب افزایش بیان ژن casp3 در سلول‌های سرطانی کولون HT29 شد. برطبق مطالعات چپو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی تعداد زیادی لاکتوباسیل‌ها از جمله، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس کازئی که توسط حرارت کشته شده بودند نشان داد که سبب کاهش درصد زیستایی رده‌های سلول‌های سرطانی شد.

در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس برویس سبب کاهش درصد زیستایی رده سلولی HT-29 شد؛ بنابراین مطالعه [۲۲] و همکارانش با مطالعه ما هم‌خوانی دارد. [۲۵]. برطبق مطالعات انجام‌شده توسط تاورنیتی و همکاران در سال ۲۰۱۱ لاکتوباسیل پلانتروم و لاکتوباسیلوس کازئی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر با کد ۲۲۰۳۰۵۰۷۹۷۱۰۰۲ تأیید شده است.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای حجت عادل‌ی در گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در این پژوهش ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

بر روی رده‌های سلول سرطانی کولون و سینه جهت آزمایشات خود استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، اثر ممانعتی بسته به نوع سوش متفاوت می‌باشد، ولی سلول کشته شده توسط حرارت لاکتوباسیلوس‌ها کاهش در صد زیستایی را نشان داد که در این مطالعه هم لاکتوباسیلوس برویس باعث کاهش درصد زیستایی رده سلولی HT-29 می‌شود؛ بنابراین با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۳۱].

لایر و همکاران در سال ۲۰۰۸ دریافتند که لاکتوباسیلوس روتری فعالیت NF-KB القاشده توسط TNF را در یک دوز و وضعیت وابسته به زمان مهار می‌کند [۳۲]. پان و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثرات تجویز دهانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را روی سرطان‌های کولورکتال موش‌ها تجزیه و تحلیل کردند. نتایج دلالت بر آن داشت که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شدت کارسینوژن (عوامل سرطان‌زا) کولورکتال را کاهش دادند. از طرفی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در موهای تیمار شده افزایش دادند. در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس برویس هم عوامل سرطان‌زا کولورکتال را کاهش داد که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۳۳]. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای آزمون‌های بالینی تأثیر پروبیوتیک‌ها در کاهش عوارض عفونی پس از جراحی را در بیماران سرطان کولورکتال نشان داده‌اند. به‌طور مشابهی، پیامدهای عملی و کیفیت در ارتباط با سلامتی طول عمر به‌طور چشمگیری در بیمارانی که تحت جراحی برشی سرطان کولورکتال در پی تیمار با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس سوبتیلیس قرار گرفته بودند، بهبود یافت [۳۴].

ازکید و همکاران در سال ۲۰۱۸ با بررسی تأثیر لاکتوباسیلوس برویس بر بهبود گاستریت معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری مدل موشی نشان دادند که در گروه‌های آلوده به عفونت بعد از درمان با لاکتوباسیلوس برویس کاهش التهاب و بهبودی حاصل شد. میزان ریشه‌کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری در گروه درمانی، بعد از بررسی بافتی، کاهش التهاب را نشان داد. در مطالعه حاضر هم لاکتوباسیلوس برویس باعث کاهش عوامل سرطان‌زای کولورکتال و رده سلولی HT-29 می‌شود؛ بنابراین نتایج مطالعه Orcid، با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۳۵].

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس برویس مسیر سیگنالینگ سلولی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولون HT29 را تحریک کرده و می‌توان در جهت استراتژی جدید درمانی و یا اجوانت تراپی برای تیمار سرطان کولون استفاده کرد.

References

- [1] Kich DM, Vincenzi A, Majolo F, Volkende Souza CF, Goettert MI. Probiotic: Effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention. *Nutricion Hospitalaria*. 2016; 33(6):1430-7. [DOI:10.20960/nh.806] [PMID]
- [2] Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Beneficial Microbes*. 2015; 6(2):209-17. [DOI:10.3920/BM2014.0067] [PMID]
- [3] Whelan K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: A review of recent clinical trials and systematic reviews. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2011; 14(6):581-7 [DOI:10.1097/MCO.0b013e32834b8082] [PMID]
- [4] Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: A review. *Clinical Therapeutics*. 2008; 30(3):453-68. [DOI:10.1016/j.clinthera.2008.03.013] [PMID]
- [5] Gertler R, Rosenberg R, Schuster T, Friess H. Defining a high-risk subgroup with colon cancer stages I and II for possible adjuvant therapy. *European Journal of Cancer*. 2009; 45(17):2992-9. [DOI:10.1016/j.ejca.2009.07.008] [PMID]
- [6] Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, et al. Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: A population-based study. *Cancer Research*. 2000; 60(24):6935-41. [PMID]
- [7] Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Schouten LJ, Koedijk FD, Roemen GM, et al. Fat and K-ras mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2004; 25(9):1619-28. [DOI:10.1093/carcin/bgh177] [PMID]
- [8] Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, et al. Aberrant crypts: Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Research*. 1991; 51(5):1564-7. [PMID]
- [9] Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24(3):1007-21. [DOI:10.1128/MCB.24.3.1007-1021.2004] [PMID] [PMCID]
- [10] Buchholz TA, Garg AK, Chakravarti N, Aggarwal BB, Esteva FJ, Kuerer HM, et al. The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11(23):8398-402. [DOI:10.1158/1078-0432.CCR-05-0885] [PMID]
- [11] Rajan T, Benlucankar V, Vincent S. Saccharomyces cerevisiae-induced apoptosis of monolayer cervical cancer cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017; 10(8):63-66. [DOI:10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18818]
- [12] Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, Macdonald JS, Labianca R, Haller DG, et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 345(15):1091-7. [DOI:10.1056/NEJMoa010957] [PMID]
- [13] Sevda ER, Kopara AT, Kivance M. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turkish Journal of Biology*. 2015; 39(1):23-30. [DOI:10.3906/biy-1402-62]
- [14] Salminen S, Bouley C, Bourtron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *The British Journal of Nutrition*. 1998; 80(S1):S147-71. [DOI:10.1079/BJN19980108] [PMID]
- [15] Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition & Health*. 1974; 29:4-8. [Link]
- [16] Scherezmeir J, de Verse M. Probiotics and synbiotics approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73(2): 361S-64. [DOI:10.1093/ajcn/73.2.361s]
- [17] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*. 2009; 9(8):537-49. [DOI:10.1038/nrc2694] [PMID]
- [18] Mumtaz PT, Bhat SA, Ahmad SM, Dar MA, Ahmed R, Urwat U, et al. LncRNAs and immunity: Watchdogs for host pathogen interactions. *Biological Procedures Online*. 2017; 19:3. [DOI:10.1186/s12575-017-0052-7] [PMID] [PMCID]
- [19] Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: Application for assessment of growth factors. *Journal of Cell Science*. 1989; 92(Pt 3):513-8. [DOI:10.1242/jcs.92.3.513] [PMID]
- [20] Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. [Cytotoxicity and anti-microbial assessment of Euphoria hebecarpa (Persian)]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2004; 3(2):75-82. [Link]
- [21] Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2006; 577(Pt 1):433-43. [DOI:10.1113/jphysiol.2006.115436] [PMID] [PMCID]
- [22] Peterson SM, Freeman JL. RNA isolation from embryonic zebrafish and cDNA synthesis for gene expression analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2009; (30):1470. [DOI:10.3791/1470]
- [23] Daniluk U. Probiotics, the new approach for cancer prevention and/or potentialization of anti-cancer treatment. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*. 2012; 1:2. [DOI:10.4172/2324-9110.1000e105]
- [24] de Moreno de LeBlanc A, Matar C, LeBlanc N, Perdigon G. Effects of milk fermented by Lactobacillus helveticus R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Research*. 2005; 7(4):R477-86. [DOI:10.1186/bcr1032] [PMID] [PMCID]
- [25] Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 42(5):452-58. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.01913.x] [PMID]
- [26] Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*. 2011; 6(3):261-74. [DOI:10.1007/s12263-011-0218-x] [PMID] [PMCID]
- [27] Kim Y, Oh S, Yun HS, Oh S, Kim SH. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumor cells. *Letters in Applied Microbiology*. 2010; 51(2):123-30. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2010.02859.x] [PMID]
- [28] Salva S, Marranzino G, Villena J, Agüero G, Alvarez S. Probiotic Lactobacillus strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International Immunopharmacology*. 2014; 22(1):209-21. [DOI:10.1016/j.intimp.2014.06.017] [PMID]
- [29] Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, Dubois RN. Modulation of apoptosis and bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research*. 1998; 58(2):362-6. [PMID]

- [30] Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clinical Nutrition*. 2010; 29(1):131-40. [DOI:10.1016/j.clnu.2009.07.004] [PMID]
- [31] Liu C, Pan T. In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2010; 18(2):77-86. [DOI:10.38212/2224-6614.2287]
- [32] Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF induced apoptosis in human myeloid leukemia derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. *Cellular Microbiology*. 2008; 10(7):1442-52 [DOI:10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x] [PMID]
- [33] Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*. 2009; 20:598-602. [DOI:10.1016/j.foodcont.2008.08.019]
- [34] Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, et al. Randomised clinical trial the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post operative infectious complications in colorectal cancer surgery a double blind study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2011; 33(1):50-63. [DOI:10.1111/j.1365-2036.2010.04492.x] [PMID]
- [35] Asgari B, Kermanian F, Khalili F, Rohani Nojede Sadat Z, Yaslianifard S. [Influence of *Lactobacillus brevis* on the recovery of gastric gastritis caused by *Helicobacter pylori* infection in a C57BL / 6 mouse model (Persian)]. *Knowledge Health*. 2018; 13(2):15-21. [Link]

This Page Intentionally Left Blank