



Investigating the effect of *Portulaca oleracea* L. nanoparticles and *Lactobacillus plantarum* probiotic bacteria extract on CacoII cell line on the expression of JAKI and JAKII genes.¹

Fatemeh Jamaloo

Department of Biology, QoMS.C., Islamic Azad University, Qom, Iran.

fjamaloo@gmail.com

Abstract

Introduction: *Portulaca oleracea* purslane nanoparticles and probiotic bacteria, which are living and useful microorganisms, which, by affecting the digestive enzymes of animals and humans, inhibit carcinogens in the body and laboratory conditions and compounds that induce cancer and tumors in laboratory animals, play an effective role in They perform to fight cancer. The purpose of this study is to investigate the effect of *Portulaca oleracea* purslane nanoparticles and *Lactobacillus plantarum* probiotic bacteria extract on CacoII cell line on the expression of JAKI and JAKII genes.

Materials and methods: In this study, which was conducted experimentally, the supernatant was isolated from the culture of *Lactobacillus plantarum*. Then, the effects of the cytotoxicity of the supernatant isolated from the bacteria and *Portulaca oleracea* purslane nanoparticles as well as the bacteria on the CacoII colon cancer cell line during the time of 24, 48 and 72 hours was checked using MTT method. Also, the expression of JAKI and JAKII genes was checked using Real Time PCR method.

Results: Supernatant containing *Lactobacillus plantarum* bacteria reduces cell proliferation. The obtained results showed that the inhibitory percentage of *Lactobacillus plantarum* supernatant on CacoII cancer cells, JAKI genes had a significant increase in expression during 48 and 72 hours. JAKII genes had a significant decreased in expression during 48 and 72 hours
Conclusion: *Lactobacillus plantarum* bacteria and *Portulaca oleracea* purslane nanoparticles can be used to create a new therapeutic solution with high effect, low side effects, biologically safe and less expensive for the treatment and prevention of colon cancer

Keywords: Probiotics, *Lactobacillus plantarum*, colon cancer, *Portulaca oleracea*, CacoII, JAKII, JAKI.



بررسی تاثیر نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* L. و عصاره باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر روی رده سلولی *CacoII* بیان ژن های JAKI و JAKII²

فاطمه جمالو

گروه زیست شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. fjamaloo@gmail.com

چکیده

هدف: نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* و باکتری های پروبیوتیک که میکروارگانیسم های زنده و مفید هستند با تأثیر بر آنزیم های گوارشی حیوانات و انسان ها، مهار عوامل سرطان زا را در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی و ترکیبات القا کننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می کنند. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* و عصاره باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* روی رده سلولی *CacoII* بر روی بیان ژن های JAKI و JAKII می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه که به صورت تجربی انجام شده است از کشت باکتری *Lactobacillus plantarum*، مایع رویی جدا شد. سپس اثرات سمیت سلولی مایع رویی جدا شده از باکتری و نانوذرات خرفه *Portulaca oleracea* همچنین باکتری ها بر روی رده سلولی سرطان کولون *CacoII* در مدت زمان 48، 72 و 24 ساعت با استفاده از روش MTT بررسی شد. همچنین بیان ژن های JAKI و JAKII با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: مایع رویی که حاوی باکتری *Lactobacillus plantarum* باعث کاهش تکثیر سلولی می شوند. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد مهار محلول رویی (سوپرناتانت) *Lactobacillus plantarum* روی سلول های سرطانی *CacoII*، ژن های JAKI در طول 48 و 72 ساعت افزایش بیان معناداری داشته است. ژن های JAKII در طول 48 و 72 ساعت کاهش بیان معناداری داشته است.

نتیجه گیری: می توان از باکتری *Lactobacillus plantarum* و نانوذرات خرفه *Portulaca oleracea*، جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره برد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، *Lactobacillus plantarum*، سرطان کولون، *Portulaca oleracea*، *CacoII*، JAKI، JAKII

² تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷ ؛ تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۶/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۱ ؛ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲

۱-مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده، غیر بیماری‌زا و بی‌خطری هستند که برای بهبود تعادل میکروبی، به ویژه در دستگاه گوارش، تجویز می‌شوند و اثرات خوبی روی سلامت میزبان خود بر جای می‌گذارند. باکتری‌های اسیدلاکتیک، مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم مهمترین پروبیوتیک‌هایی هستند که به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پروبیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف، از جمله کاهش pH روده، کاهش تهاجم ارگانیسم‌های بیماری‌زا و اصلاح پاسخ ایمنی میزبان، اثرات مفید خود را اعمال می‌کنند. این باکتری‌ها علاوه بر کمک به گوارش، مولکول‌های پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشند.

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* گیاهی علفی و یک ساله از خانواده Portulacaceae با ۲۱ جنس و ۵۶ گونه مختلف است [۱، ۲]. گیاه خرفه در مناطقی با شرایط آب و هوایی مثل خشکی، شوره زار و کمبود مواد مغذی نیز رشد می‌کند [۳].

ترکیبات شیمیایی موجود در قسمت‌های مختلف این گیاه شامل کربوهیدرات، پروتئین، کلسیم، روی، پتاسیم، سدیم، منگنز، آهن، فسفر، سلنیوم و ویتامین‌های C، E، A، فیبر، کوآنزیم Q10، اسید آمینه‌های ضروری، آلفا توکوفرول، گلوکاتینون، کاروتن، پلی‌ساکاریدها، ساپونین، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب، استروئیدها، نوراپی نفرین و دوپامین است. فلاونوئیدها از دیگر ترکیبات موجود در خرفه هستند که جز خانواده پلی‌فنول‌ها به شمار می‌آیند. از جمله ترکیبات فلاونوئیدی موجود در این گیاه می‌توان به کرستین، کامفرول، میرستین، آپیجنین، لوتئولین، ژنیستین و ژنیستین اشاره کرد، که به دلیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی یا ضد رادیکالی‌شان شناخته شده‌اند. به علاوه، آنها دارای فعالیت ضد التهابی نیز هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها، مولکول‌ها یا ترکیباتی هستند که به عنوان از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند. این رادیکال‌ها می‌توانند به سایر مولکول‌های حیاتی آسیب رسانده و باعث از دست رفتن عملکرد آنها شوند [۴، ۵].

ژن JAKI

این ژن بر روی کروموزوم ۳۱.۳p و ۳۰ اگزون دارد (شکل ۱-۷). اندازه این ژن ۳۳۵۱۲ bp می‌باشد و از روی آن طبق سایت NCBI، ۱۲ رونوشت RNA سنتز می‌شود ۱۲ رونوشت تبدیل به پروتیین می‌شود. برای طراحی پرایمر از NM_۰۰۱۳۲۱۸۵۳.۲ که بزرگترین رونوشت است استفاده شد (شکل ۱-۱) [۶].

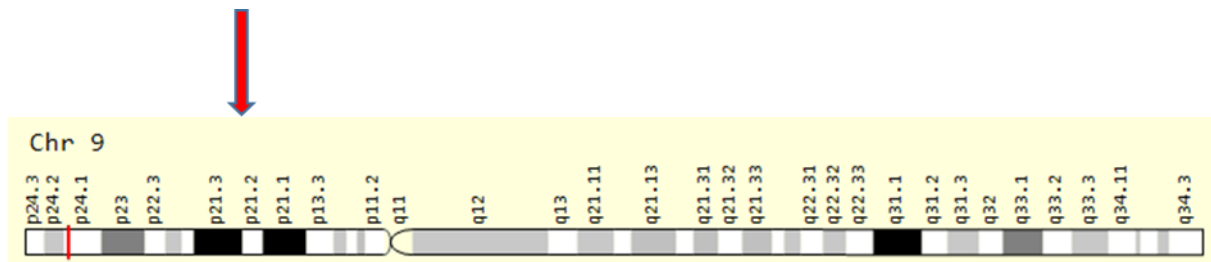


شکل ۱-۱: محل قرار گیری ژن JAKI

ژن JAKII

این ژن بر روی کروموزوم ۲۴.۱p و ۲۷ اگزون دارد (شکل ۱-۹). اندازه این ژن ۱۴۵۵۵۹ bp می‌باشد و از روی آن طبق سایت NCBI، ۹ رونوشت RNA سنتز می‌شود که ۷ رونوشت تبدیل به پروتیین می‌شود. برای طراحی پرایمر از

_NM۰۰۱۳۲۲۱۹۴.۲ که بزرگترین رونوشت است استفاده شد (شکل ۱-۲) (۷).



شکل ۱-۲: محل قرار گیری ژن JAKII

هدف این تحقیق بررسی تاثیر نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* L. و عصاره باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر روی رده سلولی *CacoII* بر روی بیان ژن های JAKI و JAKII است.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-تهیه سویه باکتری

سویه باکتری *Lactobacillus plantarum* با شناسنامه های مربوطه ۱۴۹۱۷ATCC از مرکز ذخایر ژنتیک تهران تهیه شد.

۲-۲-کشت باکتری

کپسول حاوی باکتری *Lactobacillus plantarum* به صورت کاملاً استریل، زیر هود لامینار باز کرده و مقداری از محیط اختصاصی MRS را توسط سمپلر درون کپسول ریخته تا کپسول داخل محیط حل شود، سپس محیط حاوی باکتری را از کپسول توسط سمپلر خارج کرده و به ارلن حاوی محیط MRS اضافه شد، ارلن را در انکوباتور شیکر به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد.

برای تهیه متابولیت باکتری، لوله حاوی محیط کشت و باکتری را در سانتیفریوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد، محلول رویی حاوی متابولیت باکتری است. ابتدا آن را با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل کرده و سپس از غلظت های مختلف آن جهت مشخص کردن IC_{۵۰} استفاده شد (۸).

۲-۳-تهیه لاین سلولی

رده های سلولی *CacoII* با شناسنامه های مربوطه ۱۳۹NCBI NO.C از انستیتو پاستور خریداری شد.

۲-۴-کشت سلولی

کشت سلول های جانوری روشی مناسب برای مطالعه سلول های جدا شده از بافت های مختلف انسانی و حیوانی می باشد. این روش امروزه در مطالعات زیادی نظیر تولید واکسن ها، مطالعات مربوط به سلول های سرطانی، تولید آنتی بادی های مونوکلونال، هورمون تراپی و غیره کاربردهای بسیاری دارد. در این روش سلول های خاصی از بافت های جانوری جدا شده و در محیط های کشت مخصوص در شرایط جوی مناسب، جهت مطالعات مختلف، رشد و تکثیر می یابند. در تکنیک کشت سلول عوامل مهمی مانند محیط کشت های مناسب، pH مناسب محیط، شرایط استریل محیط، درصد اکسیژن و دی اکسید کربن، دما و بسیاری عوامل در حصول نتیجه مناسب اثر گذار می باشند (۹).

۲-۵-نگهداری رده سلولی



سلول در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله و ۱٪ آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین استریپتومایسین و در انکوباتور با شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت ۹۰٪ قرار داده شد (۹).

۶-۲- پاساژ سلول‌ها

زمانی که تراکم سلولی در فلاسک‌ها به بیش از ۸۵ درصد کف فلاسک رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شوند. به این صورت که ابتدا در زیر هود لامینار، محیط کشت خالی و سلول‌ها دو مرتبه با PBS استریل شستشو می‌شوند و به آن ۱ میلی لیتر محلول EDTA-Trypsin ۰.۲٪ استریل اضافه و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار می‌گیرند و پس از مشاهده شناور شدن با میکروسکوپ معکوس، برای توقف فعالیت آنزیم هم حجم آنزیم بکار رفته محیط کشت حاوی سرم به فلاسک اضافه شد و محتوای داخل فلاسک بین فلاسک‌های جدید تقسیم گردید. نهایتاً فلاسک‌ها در انکوباتور با شرایط استاندارد نگهداری شدند. فلاسک‌ها با درج مشخصات و تاریخ، مجدداً در انکوباتور محتوی دی اکسید کربن قرار گرفتند (۹).

-انجام PCR

برای آنکه مشخص شود cDNA به درستی استخراج شده است با استفاده از پرایمرهای طراحی شده واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گرفت.

به درون میکروتیوب های ۲/۱۰ ml طبق جدول زیر مواد اضافه شده و هر یک آنها را ورتکس کرده تا کاملاً مخلوط شوند که این حجم نهایی مخلوط اصلی را تشکیل می‌دهد. این میکروتیوب‌ها آماده جهت انجام واکنش PCR به دستگاه ترموسایکلر اپندورف منتقل شد و طبق برنامه داده شده به آن، تغییرات دمایی جهت انجام مراحل PCR به منظور تکثیر DNA هدف انجام گرفت (۱۰).

-انجام Real Time PCR

Set up کردن (برای انجام تست real Time PCR) :

برای آنالیز تفسیر میزان بیان ژن مورد نظر نیاز به ژن کنترل داخلی یا House Keeping Gene وجود دارد که ژن کنترل داخلی GAPDH در نظر گرفته شد. برای بهینه‌سازی و گرفتن بهترین نتیجه تمام اجزای مورد نیاز آزمایش برای ژن‌ها در غلظت‌های متفاوت و دماهای متفاوت تست شدند و در نهایت غلظت و دمایی که بهینه‌تر بود انتخاب شد.

نکته: دما و غلظتی بهینه می‌باشد که در تست real time PCR، منحنی ذوب تک پیک را نشان دهد.

نکته: housekeeping gene ها ژن‌هایی هستند که در تمام بافت‌های بدن به یک میزان بیان می‌شوند مانند ژن GAPDH (۸).

-مطالعه آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ استفاده شد.

۳-نتایج

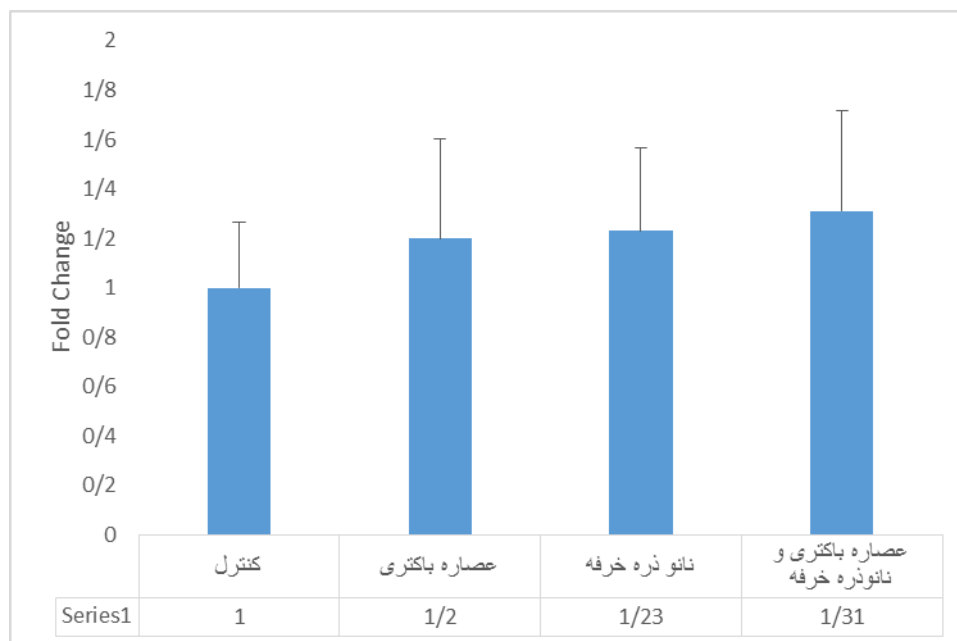
۳-۱- میزان بیان ژن JAKI در حضور باکتری و نانوذرات خرفه

میزان بیان ژن JAKI در ۲۴ ساعت نسبت در حضور عصاره باکتری به گروه کنترل ۱/۲ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد ($P < 0/05$).

میزان بیان ژن JAKI در ۲۴ ساعت نسبت در حضور نانو ذره خرفه به گروه کنترل ۱/۲۳ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد ($P < 0/05$).



میزان بیان ژن JAK1 در ۲۴ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذره خرفه نسبت به گروه کنترل ۱/۳۱ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد ($P < 0/05$)، نمودار (۱-۳).

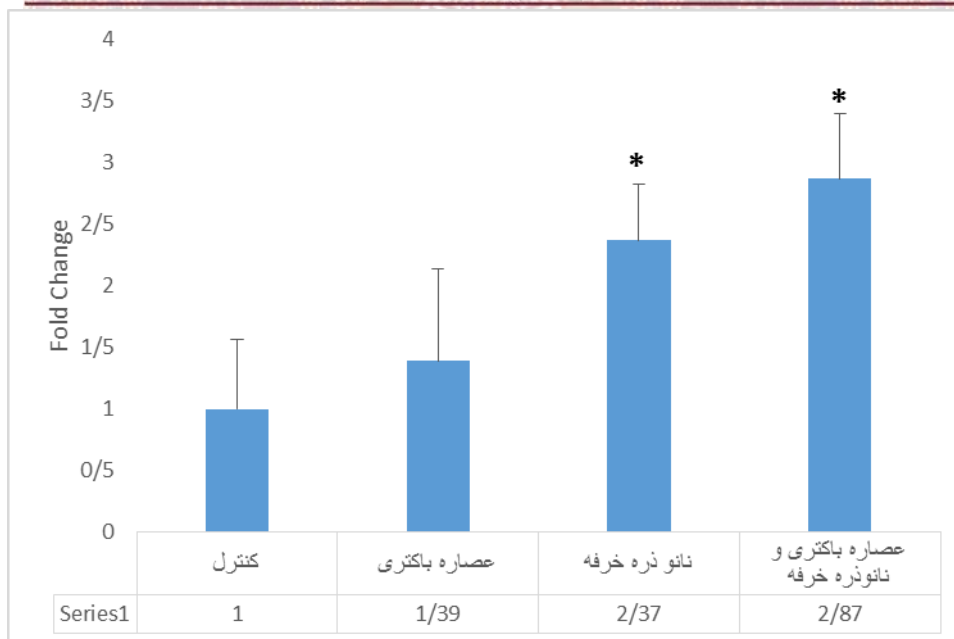


نمودار (۱-۳) نمودار بیان ژن JAK1 در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۲۴ ساعت

میزان بیان ژن JAK1 در ۴۸ ساعت در حضور عصاره باکتری ۱/۳۹ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار نمی باشد ($P < 0/05$).

میزان بیان ژن JAK1 در ۴۸ ساعت نسبت در حضور نانو ذره خرفه به گروه کنترل ۲/۳۷ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد ($P < 0/05$).

میزان بیان ژن JAK1 در ۴۸ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذره خرفه نسبت به گروه کنترل ۲/۸۷ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد ($P < 0/05$)، نمودار (۲-۳).

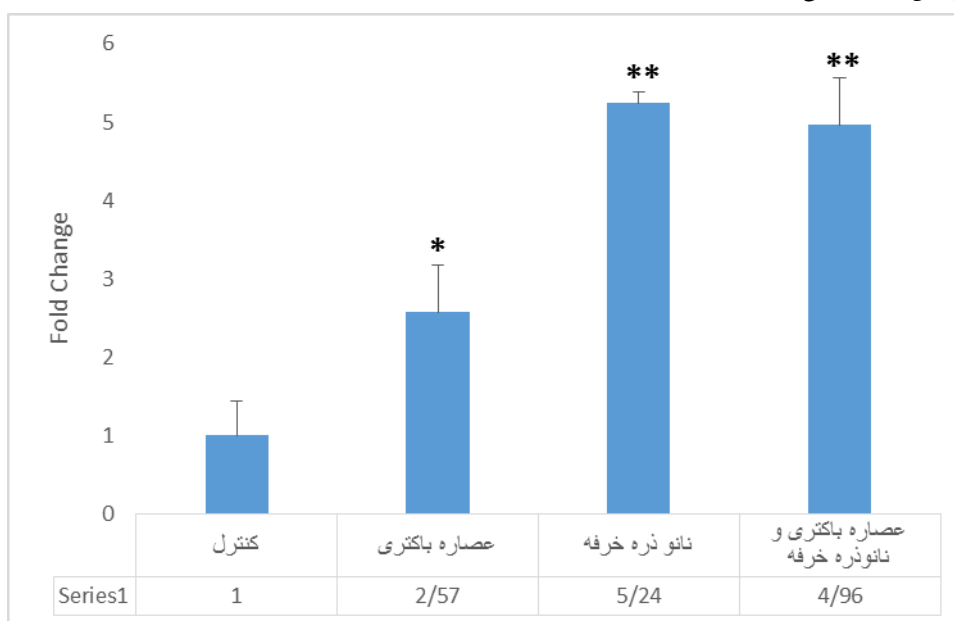


نمودار (۲-۳) نمودار بیان ژن JAK1 در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۴۸ ساعت

میزان بیان ژن JAK1 در ۷۲ ساعت در حضور عصاره باکتری ۲/۵۷ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAK1 در ۷۲ ساعت نسبت در حضور نانو ذره خرفه به گروه کنترل ۵/۲۴ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAK1 در ۷۲ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذره خرفه نسبت به گروه کنترل ۴/۹۶ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد ($P<0/05$) نمودار (۳-۳).



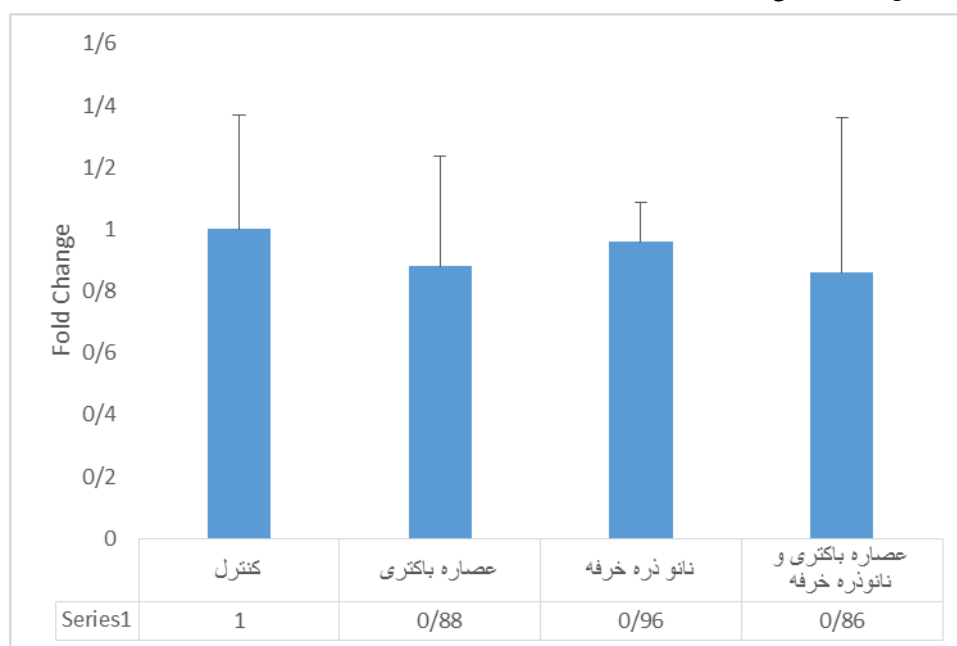
نمودار (۳-۳) نمودار بیان ژن JAK1 در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۷۲ ساعت

۳-۲ میزان بیان ژن JAKII در حضور باکتری و نانوذرات خرفه

میزان بیان ژن JAKII در ۲۴ ساعت نسبت در حضور عصاره باکتری به گروه کنترل ۰/۸۸ برابر کاهش داشته است ولی این کاهش معنادار نمی باشد. ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAKII در ۲۴ ساعت در حضور نانوذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۰/۹۶ برابر کاهش داشته ولی این کاهش معنادار نمی باشد. ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAKII در ۲۴ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانوذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۰/۸۶ برابر کاهش داشته ولی این کاهش معنادار نمی باشد. ($P<0/05$) نمودار (۳-۴).

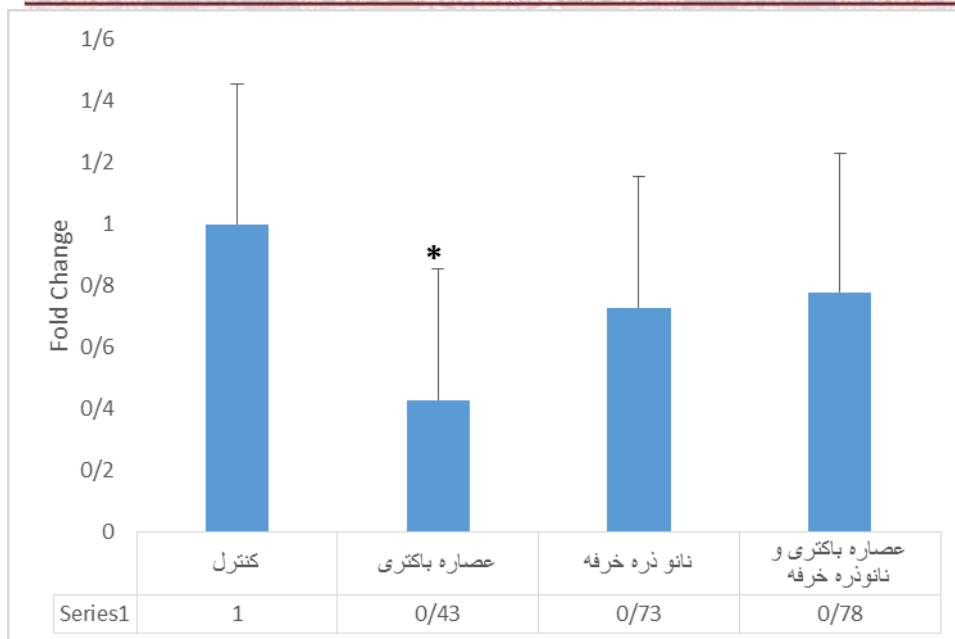


نمودار (۳-۴) نمودار بیان ژن JAKII در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۲۴ ساعت

میزان بیان ژن JAKII در ۴۸ ساعت در حضور عصاره باکتری ۰/۴۳ برابر کاهش داشته که این کاهش معنادار می باشد. ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAKII در ۴۸ ساعت در حضور نانوذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۰/۷۳ برابر کاهش داشته ولی این کاهش معنادار نمی باشد. ($P<0/05$).

میزان بیان ژن JAKII در ۴۸ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانوذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۰/۷۸ برابر کاهش داشته ولی این کاهش معنادار نمی باشد. ($P<0/05$)، نمودار (۳-۵).

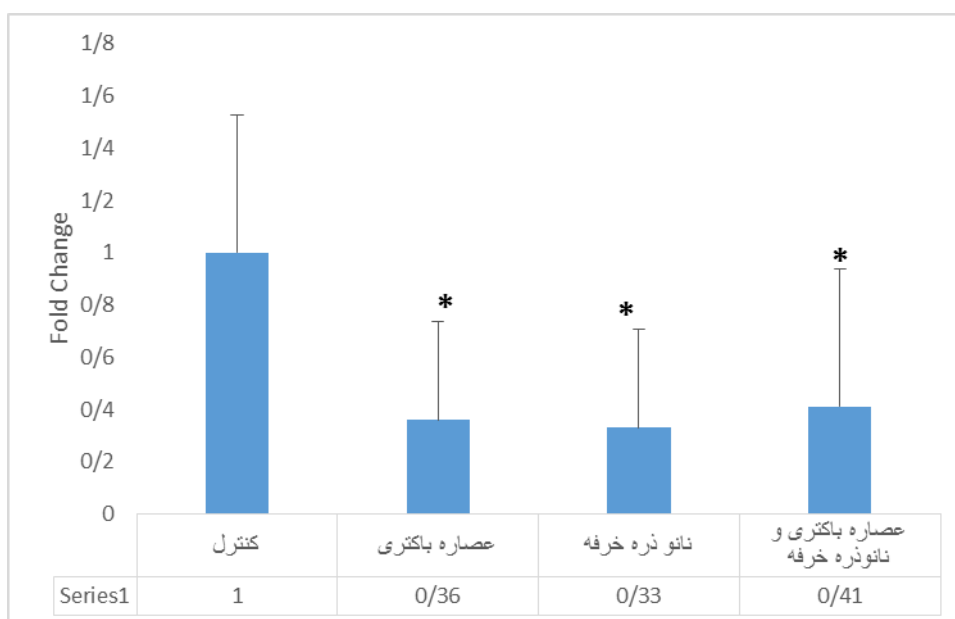


نمودار (۳-۵) نمودار بیان ژن JAKII در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۴۸ ساعت

میزان بیان ژن JAKII در ۷۲ ساعت در حضور عصاره باکتری ۰/۳۶ برابر کاهش داشته است که این کاهش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن JAKII در ۷۲ ساعت در حضور نانو ذرات خرفه ۰/۳۳ برابر کاهش داشته است ولی این کاهش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن JAKII در ۷۲ ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه ۰/۴۱ برابر کاهش داشته است و این کاهش معنادار می باشد (P<0/05)، نمودار (۳-۶).



نمودار (۳-۶) نمودار بیان ژن JAKII در حضور باکتری و نانوذرات خرفه در ۷۲ ساعت



۵- بحث

در این مطالعه بیان ژن های JAKI در حضور باکتری و نانو ذرات خرفه افزایش و بیان ژن های JAKI در حضور باکتری و نانو ذرات خرفه کاهش داشته است و در نتیجه آپوپتوز سلول ها نیز افزایش یافته است. محمودی اصل زاده در سال ۱۳۹۸ از *Bifidobacterium bifidum* بعنوان پروبیوتیک روی سرطان روده بزرگ تحقیق نمود که با نتیجه این تحقیق همسو بوده است.

Jin و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند نانو ذرات خرفه می تواند تکثیر سلولهای سرطانی کولون و سلولهای بنیادی سرطان کولون را مهار کند که این اثر وابسته به دوز آن می باشد بدلیل تشابه کار بر روی سرطان کولون هم راستا با هم هستند (۱۱).

همچنین Baricault laurent در سال ۲۰۱۸ نشان داد که *L.helaventicus* بجای پلانتاروم سلول های سرطانی ۲۹HT به جای Cacoli ۷۳ درصد تأثیر را روی مهار رشد سلول های سرطانی داشته است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد (۱۲).

Biffi کاشف بیفیدیوم اثر مهاری ۵ گونه باکتری تولید کننده اسید لاکتیک روی سلول های سرطانی سینه (VMCF)، انجام داد که هر ۵ گونه باکتری تا ۸۵ درصد رشد سلول های سرطانی را مهار کرد. که هم راستا با این پژوهش می باشد (۱۳).

Pretlow و همکاران نشان دادند که پروبیوتیک ها میتوانند به عنوان عوامل پیشگیری و تسکین علایم سرطان کولون داشته باشند (۱۴).

Altonsy و همکاران نشان داده شد که ترکیبی از پروبیوتیک به طور (*Bifidobacterium lactis*) پاسخ چشمگیری بصورت آپوپتوتیک به یک کارسینوژن را در کولون انتهایی دارد (۱۵).

جین و همکارانش در سال ۲۰۱۷ مشخص کردند که عصاره خرفه رشد سلولهای بنیادی سرطان روده بزرگ را به صورت وابسته به دوز مهار می کند که هم راستا با نتایج این تحقیق می باشد [۱۱].

L.Elise نشان داد که ترکیبات تولیدی توسط *Bacillus polyfermenticus* رشد سلولهای سرطانی ۲۹HT و سلول های سرطانی Cacoli را به ترتیب ۵۶-۳۵ درصد و ۹۵ تا ۹۹ درصد مهار کرد. نتایجی هم جهت با این پژوهش می باشد [۱۶].

L.Elise نشان داد که ترکیبات تولیدی توسط *Bacillus polyfermenticus* رشد سلول های سرطانی ۲۹HT و سلول های سرطانی Cacoli را به ترتیب ۵۶-۳۵ درصد و ۹۵ تا ۹۹ درصد مهار کرد. نتایجی هم جهت با این پژوهش می باشد (۱۶).

پروبیوتیک ها روی بیماری های Auto immune اثر دارد بر اساس تحقیقات روی بیماری های همچون IBD، CROHN، ULCERATIVE COLIT، تأثیرات بسزایی در تسکین و درمان بیماری های Inflammatory می شود (۱۷).

جهت ایجاد هرگونه اثر درمانی توسط باکتری های پروبیوتیک و عصاره آن ها، می بایستی اثرات ضدالتهابی و آپوپتوزی این سلول ها بر روی شرایط التهابی در محیط آزمایشگاهی، مورد بررسی قرار گیرد.



در بررسی Goldin سال ۲۰۱۷، گزارش هایی حاکی از تولدایی *Lactobacillus* و *Lactobacillus casei* و *acidophilus* قادرند توان القایی آپوپتوز ۵-فلوروئوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال LS۵۱۳ افزایش دهند (۱۸)

عصاره بذر خرفه از طریق فعالسازی مسیر سیگنالینگ NF-kap9paB ϵ TLR می تواند روند اثر ضد توموری خود را القا نماید که با اهداف نتیجه حاضر همسو می باشد (۱۹).

در سال ۲۰۱۸، توسط Lee Kyony Do مهار رشد سلول های توموری به وسیله بوتانول استخراجی از *B. adolescentis* را نشان داد و در این مطالعه غلظت ۲۰ میکرولیتری از بوتانول تا ۷۰ درصد توانست سلول های سرطانی *Cacoli* را از بین ببرد. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاري وابسته به غلظت بود بیشترین اثر از محلول رویی (سوپرناتانت های ۷۲) ساعته حاصل شد (۲۰).

JAKI از طریق مسیر گیرنده های مرگ سلولی و JAKII از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می شوند JAKI فعال شده باعث فعال شدن CASP3 و در نتیجه القای آپوپتوز می شود (۲۱).

کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئازها هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می نماید. پژوهش انجام شده توسط Urruticoechea و همکاران نشان داده است عوامل خطر شانس ابتلاء افراد را به سرطان کولورکتال افزایش می دهد [۲۲] تحقیقات اخیر با برخی زمینه های پژوهش حاضر همسو می باشد.

نتایج تحقیقات Wollowski و همکاران در سال ۲۰۰۱ که موید نتیجه تحقیق حاضر می باشد نشان داد مصرف خوراکی پروبیوتیک ها می تواند خاصیت ضد کارسینوژنی داشته باشد و این عمل با خنثی سازی مسمومیت ژنوتوکسین ها در روده صورت می گیرد. اثبات این مسئله در آزمایشگاه با استفاده از کارسینوژن ۱ و ۲ دی متیل هیدرازین در کولون موش نشان داده شد. مطالعات جدید نشان داده است که ترکیبات متابولیتی با طول عمر کوتاه جدا شده از شیر که توسط سویه هایی نظیر لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تخمیر شده، در غیرفعال کردن عوامل خطرزا و کارسینوژن روده بسیار موثر می باشند [۲۳].

Abrahamse و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که پس از مصرف پروبیوتیک ها در کولون موش، آنزیم محافظت کننده گلوپتایون ترانسفراز II القاء می گردد. مجموع این عوامل با هم موجب کاهش بار عوامل ژنوتوکسیک در روده و نیز باعث افزایش تولید عواملی میگردد که ترکیبات سمی را غیرفعال می سازد. به عنوان مثال بوتیرات یکی از عوامل محافظتی می باشد که باعث کاهش خطر سرطان می گردد [۲۴] که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد.

مطالعه ای بر روی مدل حیوانی و آزمایشگاهی نشان داد که باکتری های اسید لاکتیک موجود در شیر های تخمیری می توانند اثرات مهار کننده روی گسترش زخم های پیش سرطانی و تومورها در مدل حیوانی داشته باشد. به علاوه، در آزمون Ames با استفاده از گونه بیفیدوباکتریوم انیمالیس اثر مهار کننده ای در برابر عوامل موتاژن مستقیم مانند مدل حیوانی نشان داده شد [۲۵]. در آزمون ایمز موتاسیون برگشتی در سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار می گیرد و متداول ترین روش تعیین پتانسیل جهش زایی و سرطان زایی مواد شیمیایی است [۲۶].

تحقیقات Gahyva و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده است که مصرف باکتری های پروبیوتیک یا عصاره این باکتریها و یا ترکیباتی از آن ها موجب کاهش سرطان کولون و کاهش ظهور تومورها می شود. بررسی های آزمایشگاهی نشان



داده است که اجزای دیواره سلولی باکتری های پروبیوتیک با مواد موتاژن ترکیب شده و از شدت سرطانزایی آن ها می کاهد [۲۷] که موید تحقیق حاضر می باشند.

در طی چند دهه گذشته، وجود میکروارگانیسم های پروبیوتیک در انواع مختلف مواد غذایی به خصوص فرآورده های لبنی در حال افزایش بوده است. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باسیلوس کوآگلانس جزء باکتری های پروبیوتیک محسوب شده و هر دو فلور طبیعی روده هستند که اثرات مفید بسیاری روی انسان ها دارند [۲۸]. ۸۵ درصد سرطان ها در اثر جهش های ژنتیکی به وجود می آیند بنابراین می توان نتیجه گرفت بیشتر ترکیبات جهش زا به احتمال زیاد سبب سرطان می شوند. امروزه استفاده از روش ایمز جهت شناسایی مواد جهش زا رایج است که روشی به مراتب ارزان تر از سایر روش ها می باشد. Hirayama و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که اکثر سویه های مورد استفاده در تست ایمز گالاکتوز منفی بوده و باعث اختلال در اپران گالاکتوز دخیل در سنتز لیپوپلی ساکارید سطح باکتری، در بیماری زایی دچار نقص هستند. به طور کلی، مکانیسم هایی که باکتری های پروبیوتیک برای کاهش مولد موتاسیون زا و سرطان زا به کار می گیرند کاملاً شناخته شده نیست [۲۹]. اما برخی از آن ها عبارت اند از:

اتصال به ماده موتاسیون زا و جلوگیری از جذب آن ها توسط بدن و تجزیه برخی ترکیبات موتاسیون زا در بررسی خود به این نتیجه رسید که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شرایط *In Vitro* توانایی اتصال به آفلاتوکسین را دارد [۱۷]. همچنین لاکتوباسیلوس ها توانایی تجزیه ترکیبات N-نیتروزآمین موجود در مواد غذایی که عوامل مهم ایجاد سرطان محسوب می شوند، را نیز دارد [۳۰].

کاهش فعالیت برخی آنزیم های مضر و مهار باکتری های مضر روده: آنزیم های مدفوعی مانند نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، بتا-گلوکورونیداز، گلیکولیک اسید هیدرولاز قادرند ترکیبات پیش جهش زا و پیش سرطان زا را به ترکیبات جهش زا و سرطان زا تبدیل کنند. این آنزیم ها توسط باکتری های مهم روده تولید می شوند و ثابت شده است که کاهش این آنزیم های مضر که رابطه مستقیمی با کاهش باکتری های مضر دارد، ریسک ابتلا به سرطان را کاهش می دهد. در بررسی Goldin و همکارانش، گزارش هایی حاکی از توانایی باکتری های پروبیوتیک در کاهش فعالیت سه آنزیم مضر بتاگلوکورونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز به دست آمد [۱۸].

تولید متابولیت های ویژه و کاهش اسید های صفراوی: باکتری های پروبیوتیک برخی متابولیت ها مانند بوتیرات، فولات و غیره تولید می کنند که با اثر روی سلول های اپی تلیال روده، تکثیر سلول های سرطانی را کاهش می دهند. Biffi و همکارانش، در مطالعه خود نشان دادند که تولید متابولیت ها توسط باکتری های پروبیوتیک با جلوگیری از تکثیر سرطان های سلولی ارتباط دارند که با تحقیق حاضر همسو می باشد [۱۳].

سلول های باکتری های پروبیوتیک قادرند سبب تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش میزان سینوکین شوند، هم چنین عاملی ممانعت کننده از رشد تومور و کاهش سرطان می باشند [۳۱]. Sekine و همکارانش در بررسی خود، اثرات مثبت را در تحریک سیستم ایمنی موش ها در مهار مواد موتاسیون زا نشان دادند [۳۲]. هم چنین تحقیقات انجام شده، نقش مثبت باکتری های پروبیوتیکی را در کاهش عوامل جهش زا تایید می کنند.

در تحقیقات Guandalini و Kich و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شده که پروبیوتیک ها در سرکوب زخم اولیه نوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ نقش دارند [۳۳] و [۳۴].



اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک ها از طریق جلوگیری از تبدیل کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیب میتوژنی، کاهش رشد باکتری های پروکاریسینوژن، کاهش جذب میتوژن ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می باشد [۳۵]. همچنین، یکی از مکانیسم های عملکردی پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیلوس ها خاصیت ضد تکثیر سلول های سرطانی از جمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است که با اهداف تحقیق حاضر همسو می باشد (۳۶).

نتیجه گیری: می توان از باکتری *Lactobacillus plantarum* و نانوذرات خرفه جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر و یا به عنوان درمان جانبی متناسب با فلور طبیعی بدن برای درمان و همچنین پیشگیری از سرطان کولون بهره برد.

تقدیر و تشکر: بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم تقدیر و تشکر می شود.



References

1. Liu, L., et al., *Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (Portulaca oleracea) varieties*. Journal of chromatography A, 2000. 893(1): p. 207-213.
2. Gatreh-Samani, K., et al., *Purslane (Portulaca oleracea) effects on serum paraoxanase-1 activity*. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences, 2011. 13.
3. Uddin, M., et al., *Purslane weed (Portulaca oleracea): a prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes*. The Scientific World Journal, 2014. 2014.
4. Movahedian Ataar, A., et al., *Antioxidant Effect of Ziziphus vulgaris, Portulaca oleracea, Berberis integerima and gundelia tournefortti on lipid peroxidation, Hb glycosylation and Red Blood Cell Hemolysis*. Journal of Medicinal Plants, 2011. 10(40): p. 80-88.
5. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-biological interactions, 2006. 160(1): p. 1-40.
6. Jiang, M., et al., *JAKI: A key protein of cross-talk signal way in "PANoptosis" in cancer*. International journal of cancer, 2021. 149(7): p. 1408-1420.
7. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/JAKII complex initiates an apoptotic protease cascade*. cell, 1997. 91(4): p. 479-489.
8. Mesbah, N.M., W.B. Whitman, and M. Mesbah, *Determination of the G+ C content of prokaryotes*, in Methods in microbiology. 2011, Elsevier. p. 299-324.
9. Segeritz, C.-P. and L. Vallier, *Cell culture: Growing cells as model systems in vitro*, in Basic science methods for clinical researchers. 2017, Elsevier. p. 151-172
10. Joshi, C.J., et al., *What are housekeeping genes? PLoS computational biology*, 2022. 18(7): p. e1010295.
11. Jin, H., et al., *Portulaca oleracea extract can inhibit nodule formation of colon cancer stem cells by regulating gene expression of the Notch signal transduction pathway*. Tumor Biology, 2017. 39(7): p. 1010428317708699.
12. Baricault, L., et al., *Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation*. Carcinogenesis, 1995. 16(2): p. 245-252.
13. Biffi, A., et al., *Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line*. 1997.
14. Pretlow, T.P., et al., *Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa*. Cancer Research, 1991. 51(5): p. 1564-1567.
15. Altonsy, M.O., S.C. Andrews, and K.M. Tuohy, *Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (CacoII) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway*. International journal of food microbiology, 2010. 137(2-3): p. 190-203.
16. Ma, E.L., et al., *The anticancer effect of probiotic Bacillus polyfermenticus on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition*. International journal of cancer, 2010. 127(4): p. 780-790.
17. El-Nezami, H., et al., *Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media*. Journal of food protection, 1998. 61(4): p. 466-468.



18. Saarela, M., et al., *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. Journal of biotechnology, 2000. 84(3): p. 197-215.
19. Zheng, G.-Y., et al., *Portulacacerebroside A induces apoptosis via activation of the mitochondrial death pathway in human liver cancer HCCLM3 cells*. Phytochemistry Letters, 2014. 7: p. 77-84.
20. Lee, D.K., et al., *Anti-proliferative effects of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 extract on human colon cancer cell lines*. BMC cancer, 2008. 8(1): p. 1-8.
21. Köhler, C., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Evaluation of caspase activity in apoptotic cells*. Journal of immunological methods, 2002. 265(1-2): p. 97-110.
22. Urruticoechea, A., et al., *Recent advances in cancer therapy: an overview*. Current pharmaceutical design, 2010. 16(1): p. 3-10.
23. Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel, *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer*. The American journal of clinical nutrition, 2001. 73(2): p. 451s-455s.
24. Abrahamse, S., B. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, *Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells*. Carcinogenesis, 1999. 20(4): p. 629-634.
25. Brady, L.J., D.D. Gallaher, and F.F. Busta, *The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer*. The Journal of nutrition, 2000. 130(2): p. 410S-414S.
26. Horn, R.C. and V.M.F. Vargas, *Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay*. Mutagenesis, 2003. 18(2): p. 113-118.
27. Gahyva, S.M.M. and J.F. Siqueira Junior, *Direct genotoxicity and mutagenicity of endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems*. Journal of Applied Oral Science, 2005. 13: p. 387-392.
28. Shah, N., *Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods*. Journal of dairy science, 2000. 83(4): p. 894-907.
29. Hirayama, K. and J. Rafter, *The role of probiotic bacteria in cancer prevention*. Microbes and infection, 2000. 2(6): p. 681-686.
30. Rowland, I., P. Grasso, and M. Davies, *The methylation of mercuric chloride by human intestinal bacteria*. Experientia, 1975. 31(9): p. 1064-1065.
31. Matsuzaki, T., *Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota*. International journal of food microbiology, 1998. 41(2): p. 133-140.
32. Sekine, K., et al., *A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from Bifidobacterium infantis with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice*. Cancer Research, 1985. 45(3): p. 1300-1307.
33. Kich, D.M., et al., *Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention*. Nutricion hospitalaria, 2016. 33(6): p. 1430-1437.
34. Guandalini, S., E. Cernat, and D. Moscoso, *Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children*. Beneficial microbes, 2015. 6(2): p. 209-217.
35. 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 & Metabolic Care, 2011. 14(6): p. 581-587.
36. Barrons, R. and D. Tassone, *Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review*. Clinical therapeutics, 2008. 30(3): p. 453-468.