

# القای آپوپتوز در رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان و مهار رشد برخی پاتوژن‌های گوارشی با استفاده از متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی

محمدصابر ملکی<sup>۱</sup>، لیلا روحی<sup>۲\*</sup>، خلیل خاشعی ورنامخواستی<sup>۳</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** لاکتوباسیل‌ها از مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک محسوب می‌شوند و استفاده از بعضی گونه‌های آن با توان پروبیوتیک می‌تواند در جلوگیری از رشد بعضی میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا و کنترل بیماری‌ها و سرطان‌های گوارشی موثر باشد. در مطالعه‌ی حاضر اثرات پروآپوپتوزی و ضدباکتریایی لاکتوباسیلوس ساکنی بر رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان و برخی پاتوژن‌های گوارشی بررسی گردید.

**روش بررسی:** در تحقیق حاضر، اثر ضدباکتریایی متابولیت‌های کشت باکتری‌های لاکتوباسیلوس ساکنی علیه باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی به کمک روش چاهک بررسی گردید و قطر هاله عدم‌رشد ایجاد شده توسط ساکنی علیه هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا، اندازه‌گیری شد. با کشت رده سلولی (HT-29) در محیط کشت DMEM محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و تیمار سلول‌ها در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از متابولیت‌های ساکنی و انکوبه شدن در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، میزان القای آپوپتوز با استفاده از کیت آنکسین-پروپیدیوم-یدید (Annexin-PI) طبق دستورالعمل کیت در هر دو زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا، آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که ساکنی قادر به تولید متابولیت‌های مقابله‌کننده با باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی می‌باشد. نتایج تست آنکسین نیز نشان داد که با افزایش غلظت متابولیت‌ها، القای آپوپتوز در این رده سلولی (HT-29) به صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که زمینه‌ی تحقیقاتی مناسبی برای بهره‌برداری از ترکیبات فعال زیستی تولیدشده توسط لاکتوباسیلوس ساکنی در کنترل و مقابله با باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی و درمان آدنوکارسینومای کولورکتال وجود داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** لاکتوباسیلوس ساکنی، آدنوکارسینومای کولورکتال، پاتوژن‌های گوارشی، اثر پروآپوپتوزی، اثر ضد میکروبی

دریافت مقاله: آبان ۱۳۹۹

پذیرش مقاله: دی ۱۳۹۹

\* نویسنده مسئول:

لیلا روحی؛

دانشکده علوم پایه واحد شهرکرد دانشگاه آزاد اسلامی

Email :  
lrouhi59@gmail.com

۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳ مربی گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

## مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ی غیربیماری‌زایی با ویژگی‌هایی همچون مقاوم به آنزیم‌های هضم‌کننده، توانا در تحریک پاسخ‌های ایمنی و موثر بر فعالیت‌های متابولیکی روده هستند که با حفظ یا بهبود تعادل میکروبی روده می‌توانند سلامت را برای میزبان خود به ارمغان آورند. از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به‌ویژه جنس لاکتوباسیلوس به‌عنوان متداول‌ترین ارگانیسم در تولید محصولات پروبیوتیکی شناخته و معرفی شده است (۱ و ۲). پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس دارای خصوصیتی چون تحمل اسید و املاح صفراوی، تولید اسیدهای ارگانیک، ترکیبات ضد میکروبی و تجمع‌پذیری سلولی با باکتری‌های بیماری‌زا و ممانعت از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا به سطوح دستگاه گوارش می‌باشند (۳). این باکتری‌های پروبیوتیک قادرند سویه‌های بیماری‌زا را به دام انداخته و با آن‌ها تجمع یابند؛ بدین ترتیب فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا متوقف و عملکردشان مهار می‌شود (۴). لاکتوباسیلوس‌ها با این اقدام نیز از آسیب‌های DNA ناشی از میکرووب‌ها، که ارتباط زیادی با وقوع سرطان‌های روده‌ای دارند، جلوگیری می‌کنند، چرا که گزارش شده است که باکتری‌های پاتوژن ساکن در روده با تولید موادی نظیر پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل، به DNA سلول‌های اپیتلیال روده آسیب رسانده و باعث تشکیل تومور می‌شوند (۵). به‌علاوه آنها با مکانیسم‌هایی از جمله افزایش سطح سیتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز و فعال کردن ماکروفاژها، بدون ایجاد پاسخ التهابی، سیستم ایمنی را در برابر سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای کولورکتال، که دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پستان و سومین سرطان شایع در مردان پس از سرطان پروستات و ریه است، تحریک می‌کنند (۶ و ۷). در این میان القای آپوتوز، دیگر مکانیسمی است که هم‌اکنون شواهد زیادی مبنی بر توانایی پروبیوتیک‌ها در تنظیم آن وجود دارد؛ که از جمله‌ی آن می‌توان به باکتری لاکتوباسیلوس روتری اشاره کرد که قادر است تکثیر سلولی را در سلول‌های سرطانی میلوما از طریق پیشبرد آپوتوز و افزایش بیان پروتئین‌های کینازی پیش آپوتوزی کاهش دهد (۸). تحقیقات گذشته و در حال انجام بر روی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های پروبیوتیکی همگی حکایت از توانایی آنها در درمان و کنترل بیماری‌های

میکروبی و سرطان‌ها دارد؛ برای مثال اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلاتاروم، علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس نشان داده شده است (۹) یا بررسی اثر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم بر روی سلول‌های سرطانی cacoII (رده سلولی سرطان روده بزرگ) نشان داد که مایع رویی کشت بیفیدوباکتریوم روی این سلول‌های سرطانی اثر مهاری دارد (۱۰). از این رو به‌نظر می‌رسد حمایت از تاثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر سلامت انسان مستلزم ارایه شواهد آزمایشگاهی هر چه بیشتر باشد. در این راستا، در مطالعه‌ی حاضر اثرات پروآپتوزی و ضدباکتریایی لاکتوباسیلوس ساکنی بر رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان و برخی پاتوژن‌های گوارشی شامل یرسینیا انتروکولیتیکا، سالمونلا انتریکا انتریتیدیس شیگلا فلکسنری و شیگلا سونئی به‌دنبال افزایش عوارض بیماری‌های میکروبی و سرطانی گوارشی و ایجاد مقاومت به درمان‌های مرسوم، با روش جدید مبتنی بر متابولیت‌های میکروبی، بررسی گردید.

## روش بررسی

این مطالعه‌ی پژوهشی به‌صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۷ تا شهریور ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی و مرکز تحقیقات باکتری‌شناسی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. باکتری مورد نظر تحقیق یعنی لاکتوباسیلوس ساکنی از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری گردید.

## ● کشت میکروبی و سلول سرطانی

به‌منظور جداسازی متابولیت ضد میکروبی تولیدی از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری در محیط TSB استفاده و کشت‌ها در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس سلول‌ها از سوپرناتانت جداسازی شد و از سوپرناتانت سلول‌ها جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی استفاده گردید. با استفاده از پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی (به قطر ۵ mm) بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار ایجاد شد. به دنبال آن هرکدام از باکتری‌ها شامل یرسینیا انتروکولیتیکا (PTCC ۱۱۵۱)، سالمونلا انتریکا انتریتیدیس (PTCC ۱۷۰۹)، شیگلا فلکسنری (PTCC ۱۲۳۴) و شیگلا سونئی (ATCC ۹۲۹۰)، به ۳ ml محیط کشت NB Broth اضافه شدند

با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، با شماره محصول (۵۵۶۵۴۷)، ارزیابی گردید. از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر (۱۱) متابولیت ساکنی در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت جهت بررسی آپوپتوز استفاده شد. سلول‌ها را پس از شستشو با PBS و آنزیم تریپسین (Gibco، آمریکا) از پلیت جدا نموده و سانتیفریوژ شدند. رنگ‌های Annexin-V متصل به FITC و PI (BD Pharmingen) به میزان ۵ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند و آماده‌ی شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur، آمریکا)؛ شمارش سلولی در واحد  $10^4$  صورت گرفت.

### • آنالیز آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، نرم‌افزار FlowJo و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست دانکن (Duncan) تجزیه و تحلیل شدند. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $P < 0.05$  بود.

### یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده براساس روش Well diffusion assay، نشان‌دهنده‌ی اثر مهارتی مناسب متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی بر باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی می‌باشد (جدول ۱). طی این روش بیشترین اثر مهارتی با مهار ۱۳/۲۰ میلی‌متر بر علیه یرسینیا انتروکولیتیکا و کمترین میزان مهارکنندگی با مهار ۱۱ میلی‌متر بر علیه شیگلا سونشی صورت گرفت. اثر مهارتی برای سایر عوامل بیماری‌زای باکتریایی با میانگین ۱۱-۱۲ میلی‌متر گزارش شد.

تا کدورتی معادل کدورت لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند به‌دست آید، سپس بر روی محیط کشت جامد مولر هیتون آگار به وسیله‌ی سوآپ استریل و به‌صورت سفره‌ای کشت داده شدند. در ادامه به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس ساکنی به چاهک‌ها اضافه و در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله‌ی عدم رشد علیه باکتری‌ها و بود یا نبود فعالیت ضد میکروبی با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی را که دارای هاله‌ی عدم رشد بودند درون لوله فالکون ۱۵ ml ریخته، درون سانتیفریوژ با دور  $12000\text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادند تا سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس ساکنی از خود باکتری جدا شود. سپس مقدار ۲ ml از سوپرناتانت را درون ویال‌های لیوفیلیزه ریخته، و درون فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  قرار داده و پس از مدت ۲۴ ساعت ویال‌ها درون دستگاه فریز درایر، قرار داده شد و سوپرناتانت ابتدا فریز و سپس خشک گردید و در نهایت نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. رده‌ی سلولی HT-۲۹ از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. در محیط کشت (DMEM) (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد (FBS) (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد (Penstrep) (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Mettler, Germany) با فشار ۵ درصد گاز  $\text{CO}_2$ ، رطوبت ۹۰ درصد و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت‌کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/ EDTA استفاده شد.

### • روش فلوسیتومتری

القای آپوپتوز در رده سلولی HT-۲۹، از طریق تست Annexin V-FITC/PI،

جدول ۱: میزان مهارت‌کنندگی متابولیت‌های تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ساکنی در مهار باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی بر حسب میلی‌متر (روش چاهک)

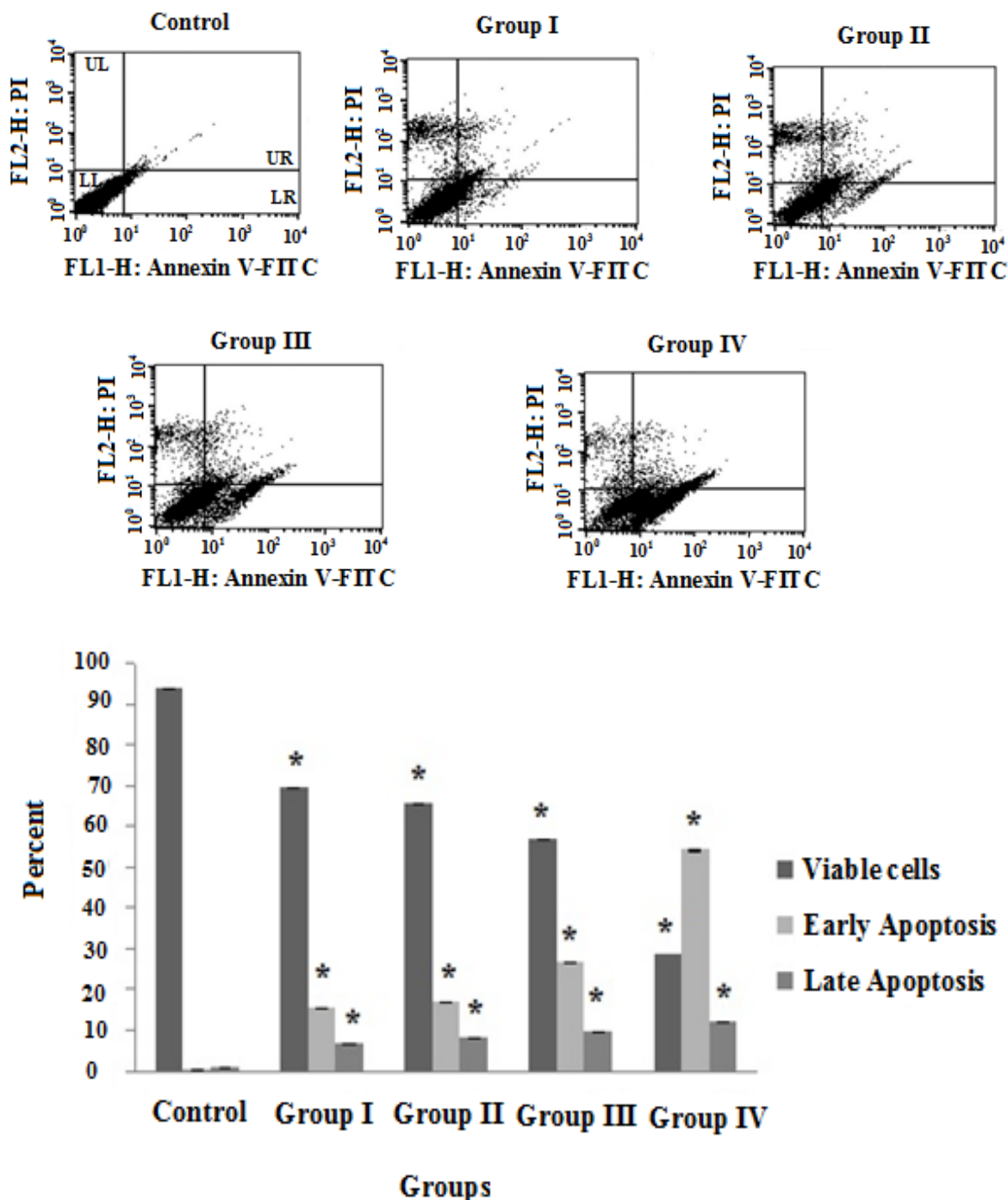
سویه‌های میکروبی	قطر هاله ممانعت‌کننده‌ی رشد متابولیت‌های تولیدی (بر حسب میلی‌متر)
یرسینیا انتروکولیتیکا	۱۳/۲۰
سالمونلا انتریکا/انتریتیدیس	۱۳/۱۱
شیگلا فلکسنری	۱۲/۱۸
شیگلا سونشی	۱۱

HT-۲۹ به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این تست خبر از افزایش درصد مرگ سلولی به‌صورت وابسته به دوز در

به‌منظور بررسی میزان القای آپوپتوز، تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی بر میزان القای آپوپتوز در رده سلولی

مرحله‌ی ابتدایی و انتهای آپوپتوز هستند با افزایش غلظت متابولیت افزایش یافته‌اند، که این افزایش درصد آپوپتوز نسبت به گروه کنترل در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار می‌باشد (شکل ۲).

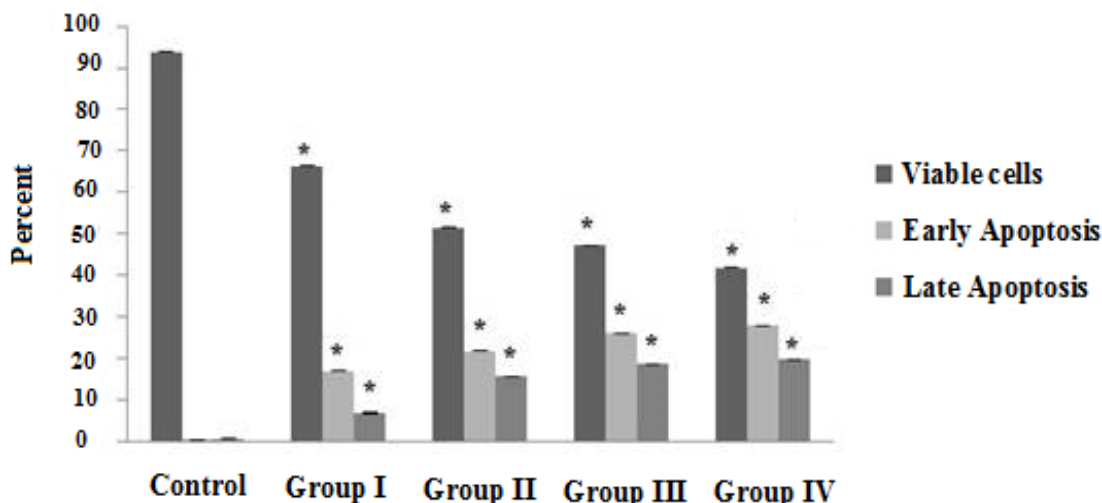
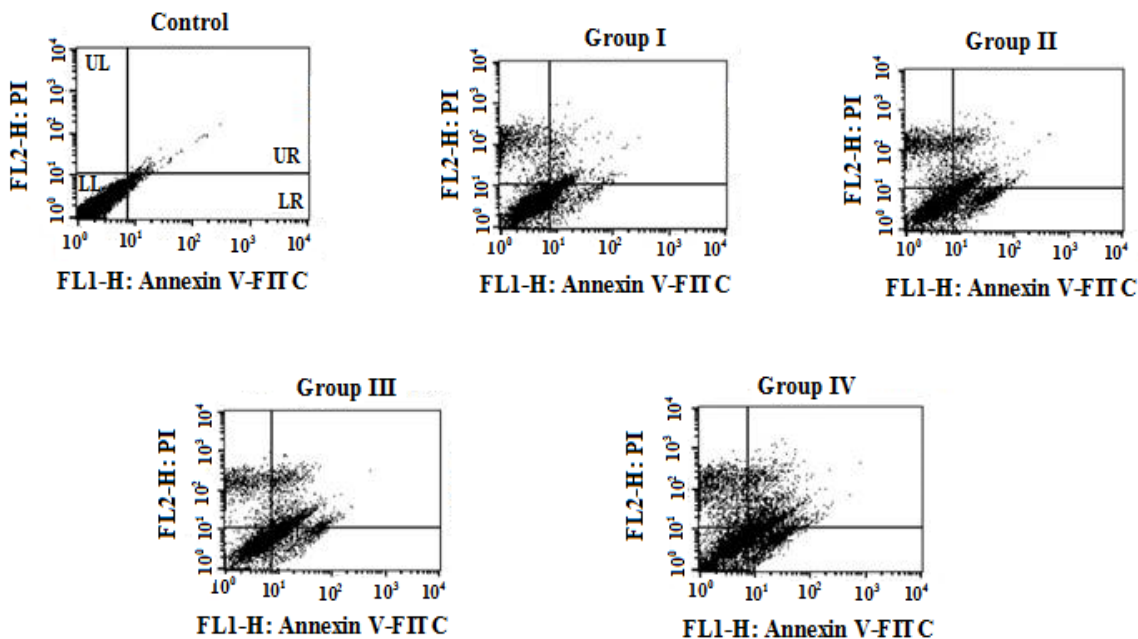
گروه‌های آزمایشی تیمار می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ و ۲ دیده می‌شود، درصد سلول‌های زنده در سایر گروه‌ها در هر دو زمان انکوباسیون نسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می‌دهد که این اختلاف از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است ( $P \leq 0.032$ ). همچنین درصد سلول‌هایی که در



شکل ۱: درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های HT-۲۹ تحت تیمار با غلظت‌های مختلف متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی ۵ (گروه I)، ۱۰ (گروه II)، ۱۵ (گروه III) و ۲۰ (گروه IV) میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت  $P < 0.00049$  در مقابل گروه کنترل.

داده‌ها به صورت  $mean \pm sd$  نمایش داده شده‌اند.

علامت (\*) نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل است.



شکل ۲: درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های HT-۲۹ تیمار با غلظت‌های مختلف متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی ۵ (گروه I)، ۱۰ (گروه II)، ۱۵ (گروه III) و ۲۰ (گروه IV) میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت  $P < 0.0001$  \* در مقابل گروه کنترل.

داده‌ها به صورت  $mean \pm sd$  نمایش داده شده‌اند.  
 علامت (\*) نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل است.

## بحث

بررسی‌های زیادی برای ارزیابی تاثیر این باکتری‌ها بر سلامت مصرف‌کننده صورت گرفته است. در این راستا مشخص شده است که متابولیت‌های حاصل از کشت لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های اسیدلاکتیک و عمده‌ترین باکتری با توان پروبیوتیکی، می‌توانند به‌عنوان ترکیب ضد میکروبی و ضدسرطانی کاربرد غذایی و دارویی فراوان داشته باشند (۱۲ و ۱۳). به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۵ اثر لاکتوباسیلوس پلانتروم بر روی سودموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی اثر مهاري رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم بر روی سودموناس آئروژینوزا را

با توجه به فراوانی بیماری‌های گوارشی در دنیا و افزایش روزافزون مقاومت دارویی، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید، جهت پیشگیری و درمان این بیماری‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که تاثیرات مفیدی مانند بهبود سیستم ایمنی، جلوگیری از استقرار و رشد باکتری‌های بیماری‌زا، کاهش جذب کلسترول و کاهش احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال دارند. امروزه

میکروبی و سرطانی گوارشی موثر باشد.

## نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بیانگر این مسئله است که متابولیت‌های تولیدشده توسط لاکتوباسیلوس ساکنی قادرند از عفونت‌های باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی جلوگیری کنند و با تاثیرگذاری بر مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، آپوتوز را در سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال انسان القا نماید و از این طریق در درمان سرطان کولورکتال مؤثر باشند. به‌طورکلی، با توجه به اختلال مشاهده شده در روند رشد و تکثیر باکتری‌های پاتوژن و سلول‌های سرطانی، در نتیجه‌ی قرارگیری در معرض متابولیت‌های باکتری‌های پروبیوتیک، انجام مطالعات بیشتر در این زمینه ضمن غلبه بر محدودیت‌هایی همچون جلوگیری از بروز آلودگی‌های زیستی ناشی از به‌کارگیری سویه‌های پاتوژن و تهیه نمونه‌های سرطانی، با به‌کارگیری متابولیت‌های سایر پروبیوتیک‌ها و دیگر انواع باکتری‌های بیماری‌زا و بدخیمی‌ها توصیه می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان «تعیین اثرات پروآپتوزی و ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس ساکنی بر رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان (HT-۲۹) و برخی پاتوژن‌های گوارشی» مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به کد ۱۵۳۳۰۵۳۹۱۵۱۱ و کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.028.1397 در سال ۱۳۹۷ می‌باشد.

نشان داد(۱۴). در سال ۲۰۰۸ اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتروم، علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس نشان داده شد(۹). در سال ۲۰۱۵، Siao و همکاران در نتیجه‌ی بررسی دو سویه‌ی لاکتوباسیلوس بومی و ۱۰ باکتری لاکتیک اسید، عملکرد آپوتوزی و آنتی اکسیدانی قوی سویه‌های بومی را نشان دادند(۱۵). مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۶ نیز اثر مهارتی متابولیت‌های سودوموناس UW4 بر رشد سلول‌های آدنوکارسینومای پستان را نشان داد(۱۱). در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های ساکنی بر باکتری‌های بیماری‌زا و اثر سابتوتوکسیستی آن بر سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال را تایید نمود(۱۶). در تحقیق حاضر نیز توانایی متابولیت‌های لاکتوباسیلوس ساکنی در مهار باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی و خاصیت پروآپتوزی آن بر روی سلول‌های سرطانی، در سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای کولورکتال انسان (HT-۲۹)، بررسی شد. در این تحقیق خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی لاکتوباسیلوس ساکنی بر اساس روش چاهک نشان داد که این ترکیبات فعال زیستی اثر مهارتی مناسبی بر رشد سایر عوامل بیماری‌زای باکتریایی مورد نظر تحقیق دارد. علاوه بر آن با افزایش درصد مرگ سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای کولورکتال در سایر گروه‌های تیمار با متابولیت‌های تولیدی لاکتوباسیلوس ساکنی نسبت به گروه کنترل، خاصیت پروآپتوزی متابولیت‌های ساکنی تایید شد. با توجه به اثرات مهارتی قابل توجه لاکتوباسیلوس ساکنی علیه باکتری‌های بیماری‌زای گوارشی و سلول‌های رده‌ی آدنوکارسینومای کولورکتال، می‌توان امیدوار بود که استفاده از متابولیت‌های تولیدی این باکتری به‌عنوان یک پروبیوتیک در فرآورده‌های غذایی و دارویی بتواند در پیشگیری و درمان بیماری‌های

## References

1. Homayouni A, Amini A, Keshtiban AK, Mortazavian AM, Esazadeh K & Pourmoradian S. Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. Starch 2014; 66(1-2): 102-14.
2. Rokhtabnak N, Khaleghi M & Sasan HA. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iranian Journal of Medical Microbiology 2016; 10(1): 24-34[Article in Persian].
3. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodanifar H & Vaezi Khakhki MR. The co-aggregation effects of probiotic lactobacillus against some pathogenic bacteria. Iranian Journal of Medical Microbiology 2015; 9(3): 14-22[Article in Persian].
4. Chen H & Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2003; 2(3): 82-100.
5. Karam AM, Ebrahimi S, Mohammadi R, Mohammadi R, Mortazavian AM, Sadeghi E, et al. The role of probiotics in colon cancer prevention. Teb va Tazkieh 2015; 24(2): 29-42[Article in Persian].



6. Rahimi Pordanjani S, Baeradeh N, Lotfi MH & Pourmohammadi B. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival rates and risk factors. *Razi Journal of Medical Sciences* 2016; 23(144): 41-50[Article in Persian].
7. Wang L, Shen X, Wang Z, Xiao X, Wei P, Wang Q, et al. A molecular signature for the prediction of recurrence in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Cancer* 2015; 14(22): 1-10.
8. Iyer C, Kosters 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-kappaB and MAPK signalling. *Cellular Microbiology* 2008; 10(7): 1442-52.
9. Anas M, Eddine HJ & Mebrouk K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2008; 3(2): 39-49.
10. Rolfe R. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* 2014; 130(2 S): 396-402.
11. Pasiar M, Rouhi L, Bamzadeh Z & Hejazi SH. In vitro selective growth inhibition of breast adenocarcinoma cell lines by *Pseudomonas* SP. UW4 metabolites. *Tehran University Medical Journal* 2016; 74(9): 614-20[Article in Persian].
12. Wadher K, Mahore JG & Umekar M. Probiotics: Living medicines in health maintenance and disease prevention. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2010; 1(3): 1-9.
13. Naeemi Z, Koohsari H & Pordeli H. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from bovine colostrum in livestock farms of Ramian Township in located in the north of Iran. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 2019; 9(1): 1097-107[Article in Persian].
14. Valdez JC, Peral MC, Rachid M, Santana M & Perdigón G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment. *Clinical Microbiology and Infection* 2005; 11(6): 472-79.
15. Siao AC, Hou CW, Kao YH & Jeng KC. Effect of sesamin on apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer mcf-7 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; 16(9): 3779-83.
16. Malaki MS, Rouhi L & Khashei Varnamkhasti K. Cytotoxic and antimicrobial effects of *Lactobacillus Sakei* on human colorectal adenocarcinoma cell line(HT29) and some pathogenic microorganisms. *Tehran University Medical Journal* 2020; 78(10): 644-50[Article in Persian].



# Apoptotic Induction in Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line and Growth Inhibition of Some Gastrointestinal Pathogenic Species by *Lactobacillus Sakei* Metabolites

Mohammad Saber Maleki<sup>1</sup> (M.S.), Leila Rouhi<sup>2\*</sup> (Ph.D.),  
Khalil Khashei Varnamkhasti<sup>3</sup> (Ph.D.)

1 Master of Science in Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2 Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3 Instructor, Department of Genetics, School of Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

## Abstract

Received: Oct 2020  
Accepted: Dec 2020

**Background and Aim:** *Lactobacillus* is the most important genus of lactic acid bacteria and the use of some species of *lactobacillus* with the probiotic potential can be effective for inhibition of the growth of some pathogens and control of gastrointestinal diseases and cancers. In this study, the pro-apoptotic and antimicrobial effect of *Lactobacillus sakei* on human colorectal adenocarcinoma cell line and some gastrointestinal pathogenic species was examined.

**Materials and Methods:** In this study, the antimicrobial activity of metabolites of *Lactobacillus sakei* was assessed by Well Diffusion Agar(WDA) method against some gastrointestinal pathogenic bacteria. HT-29 colorectal adenocarcinoma cancer cells were cultured in DMEM medium with 10% bovine serum. The cells were treated in 5, 10, 15 and 20 mg/ml concentrations of *sakei* metabolites and incubated at 24 and 48 hours. Apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC/PI kit according to the manufacturers protocol in both incubation times. For error reduction, each test was performed in triplicate

**Results:** The results of this study indicate that *sakei* was able to produce antimicrobial metabolites against gastrointestinal pathogenic bacteria. Also, the results of the Annexin test showed that with increasing concentration of *sakei* metabolites in dose dependent manner, induction of apoptosis in this cell line increases( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that there is a good research field for the use of bioactive compounds produced by *Lactobacillus sakei* in the control of gastrointestinal pathogenic bacteria and treatment of human colorectal adenocarcinoma.

**Keywords:** *Lactobacillus Sakei*, Colorectal Adenocarcinoma, Gastrointestinal Pathogens, Pro-Apoptotic Effect, Antimicrobial Effect

\* Corresponding Author:  
Rouhi L  
Email :  
lrouhi59@gmail.com