مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره ۵
آذر-دی ۱۴۰۱، صفحه ۲۱۲۴-۲۱۱۴

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 65, No.5, P: 2114-2124
Nov –Jan 2023

مقاله اصلی

بررسی اثر ضدسرطانی لانتی‌بیوتیک Bovicin HC5

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۷- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۴

شیدا بوذری[۱]
روناک بختیاری[۲*]
هاتف آجودانی فر[۳]
سید عطاالله سادات شاندیز[۴]

[۱]دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحددامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
[۲]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)
[۳]استادیار قارچ شناسی ، گروه زیست شناسی، واحددامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
[۴]گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: bakhtiarironak80@gmail.com

خلاصه

مقدمه

شیمی درمانی سرطان به‌دلیل اثرات نامطلوب داروهای ضدسرطانی یک چالش بزرگ است. لذا تلاش بر آن است تا از محصولات طبیعی با پتانسیل درمانی و بی‌خطر برای درمان انواع بیماریها استفاده شود. هدف این پژوهش کشف پتانسیل ضدسرطانی پری‌بیوتیک Bovicin HC5 است.

روش کار

سنجش بقای سلول‌های کارسینوم هپاتوسلولار انسانی Huh-7 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف Bovicin HC5 به‌روش MTT بررسی شد. آپوپتوز سلولی با سنجش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی Huh-7 تیمار شده با غلظت IC_{50} Bovicin HC5 بررسی شد. جهت ارزیابی توانایی تهاجم سلول‌های سرطانی Huh-7 تیمار شده با دوزهای زیرکشنده Bovicin HC5 از روش Boyden Chamber استفاده شد. میزان بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک *bax*، آنتی‌آپوپتوتیک *bcl-2* و ژن مرجع *actin*- درسلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت IC_{50} Bovicin HC5 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روشReal Time PCR، مورد بررسی کمی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری ANOVA استفاده شد ($P<۰/۰۵$). ۱/۹۱، ۲/۳۶ و ۲/۶۲

نتایج تست MTT نشان داد که زنده‌مانی سلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت‌های مختلف Bovicin HC5 به‌طور معنی‌داری وابسته به غلظت و زمان تیمار کاهش پیدا کرده است ($p<۰/۰۰۱$). به‌طوری‌که بیشترین تأثیر درغلظت ۴۰۰ µM و مدت ۷۲ ساعت مشاهده شد. غلظت IC_{50} Bovicin HC5 برابر با ۳۰۰µM به‌دست آمد. فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های Huh-7 تیمار شده پس از ۷۲ ساعت به‌صورت وابسته به زمان افزایش معنی‌داری داشتند و نسبت به کنترل به‌ترتیب حدود ۱/۹ برابر ($p<۰/۰۱$)، ۲/۳۶ برابر ($p<۰/۰۰۱$) و ۲/۶۲ برابر ($p<۰/۰۰۱$) شدند. توان تهاجم سلول‌های سرطانی Huh-7 تیمار شده با دوز زیرکشنده Bovicin HC5 به‌طور وابسته به دوز کاهش یافت و در غلظت ۲۵۰µM بدون اثر کشندگی شدید، حداقل توان تهاجم را نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین بیان ژن پروآپوپتوتیک *bax* و آنتی‌آپوپتوتیک *bcl-2* در سلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت IC_{50} Bovicin HC5 به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌ترتیب افزایش($p<۰/۰۰۱$) و کاهش($p<۰/۰۰۱$) یافت. درنتیجه، Bovicin HC5 ممکن است نوید بخش کشف یک استراتژی جدید برای درمان کارسینوم هپاتوسلولار انسانی بوده و داروی جدیدی با فعالیت ضدتومور و ضدمتاستاتیک و بدون عوارض جانبی تولید گردد.

کلمات کلیدی

کارسینوم هپاتوسلولار انسانی، پری‌بیوتیک، Bovicin HC5، ضدمتاستاز، آپوپتوز

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

سرطان، پس از بیماری‌های قلبی عروقی و عفونی، سومین عامل مرگ و میر در جهان است. سرطان کبد یکی از شایع‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا است. فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در بروز این سرطان مؤثر می‌باشند (۱). هپاتوسلولار کارسینوما (سرطان اولیه کبد) از سلول‌های کبدی برمی‌خیزد و متمایز از سرطان ثانویه کبد است که برخاسته از دیگر قسمت‌های بدن بوده و به کبد گسترش می‌یابند (۲, ۳). سمیت سلولی غیرانتخابی داروهای صناعی، دانشمندان را ترغیب کرد تا به دنبال ایجاد استراتژی‌های جدیدی برای درمان سرطان باشند. آخرین گزارش‌ها حاکی از آن است که حداقل ۶۰٪ از داروهای ضدسرطان از طبیعت به‌دست می‌آیند (۱). داروهای ضدسرطان طبیعی بی‌خطرتر و زیست تخریب پذیرتر از داروهای شیمی درمانی صناعی هستند (۲). لذا اهمیت درمان سرطان و اثرات جانبی مضر ناشی از آن سبب شده است که ادعای اثرات ضدجهش‌زایی و ضدسرطان‌زایی پروبیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌شدت مورد توجه و پژوهش قرار گیرد (۴, ۵). متابولیت‌های پروبیوتیکی با استفاده از خاصیت ضدالتهابی، ضدتکثیری و ضدسرطانی خود و با تأثیر بر فیزیولوژی روده موجب جلوگیری از متاستاز و ایجاد آپوپتوز و ایمنی هوموستاز می‌شوند. خواص ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها براساس ترشح پروتئازها و یا پروتئین‌های ایمنوگلوبولین و یا غیرفعال کردن سموم مترشحه می‌باشد (۶, ۷).

استرپتوکوک بوویس HC5، یک باکتری پروبیوتیک، پپتیدی به‌نام Bovicin HC5 (۲/۴ کیلودالتون) ترشح می‌کند که یک لانتی‌بیوتیک و باکتریوسین قوی است. ساختار و عملکرد Bovicin HC5 مشابه با Nisin است. در این تحقیق فعالیت ضدسرطانی Bovicin HC5 و اثرات سایتوتوکسیک این ترکیب بر رده سلولی سرطانی کبد انسانی Huh-7 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

در مطالعه حاضر، عصاره Bovicin HC5 همانطور که توسط Mantovani و Russell (۲۰۰۲) انجام شد تهیه شد (۸). رده سلولی کارسینوم هپاتوسلولار انسانی Huh-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت DMEM-LG همراه با۱۰٪ FBS و۱٪ آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین-استرپتومایسین) (Gibco, Invitrogen, Germany) در ۳۷°C، فشار یک اتمسفر، رطوبت۹۰٪ و ۵٪ CO_2 به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

بررسی اثر توکسیسیتی Bovicin HC5 بر سلول‌های Huh-7

برای بررسی اثرات ضدسرطانی Bovicin HC5 در هرچاهک پلیت ۹۶-خانه حدود ۳×۱۰^{۳} سلول Huh-7 پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با غلظت‌های مختلف ۵۰ تا ۵۰۰ میکرومولار، Bovicin HC5 مواجه شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، اثرات سایتوتوکسیک این ماده بر زنده‌مانی سلول‌های Huh-7 توسط تست MTT بررسی شد. به‌طور خلاصه، ۷۰ میکرولیتر از محیط کشت روی سلول‌ها برداشته و ۱۵ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma, Germany) (۵ میلی‌گرم از پودر MTT در۱میلی‌لیتر محیط کشت) در هر چاهک افزوده و انکوبه گردید. پس از ۳ تا ۴ ساعت، ۱۰۰میکرولیتر DMSO به هر چاهک افزوده و جذب نوری در طول موج۵۷۰ نانومتر توسط الایزا-ریدر (Biorad) ثبت گردید.

بررسی اثر Bovicin HC5 بر آپوپتوز سلولی با سنجش فعالیت کاسپازها

برای ارزیابی اثر Bovicin HC5 در القای آپوپتوز در سلول‌های Huh-7، روش رنگ‌سنجی فعالیت آنزیم‌های کاسپاز (۳، ۸ و ۹) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده کیت (سیگما) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، تعداد $۱۰^{۶}$سلول Huh-7 در هر چاهک پلیت ۶-خانه کشت و پس از ۲۴ ساعت باغلظت Bovicin IC_{50} HC5 تیمار و مجدداً به‌مدت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت انکوبه شد.

سپس سلول‌ها تریپسینه و با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند، رسوب سلولی به‌مدت یک ساعت در ۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده لیز و لیزات سلولی در ۲۰۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار ۵µL از پروتئین‌های سیتوزولی استخراج شده با ۸۵µL بافر واکنش و ۵µL از سوبسترای هریک از کاسپازها جداگانه به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. افزایش فعالیت کاسپازها با مقایسه نتایج گروه تست با گروه کنترل (تیمار نشده) گزارش شد.

بررسی اثر Bovicin HC5 بر تهاجم سلول‌ها به روش Boyden Chamber

به منظور بررسی پتانسیل متاستاز سلول‌های Huh-7 پس از مواجهه با دوز بهینه Bovicin HC5 از تست Boyden Chamber استفاده شد. در پلیت مدل غشای پایه (ECMatrix)، حدود 10^6 سلول Huh-7 کشت داده شد. حفره بالایی هر چاهک حاوی محیط کشت فاقد FBS، و حفره پایینی، حاوی محیط کشت با ۱۰٪ FBS بود. گروه‌های تست با غلظت‌های زیرکشنده (<IC_{50}) Bovicin HC5 تیمار شدند. سلول‌های سرطانی که توانایی تهاجم داشته باشند از غشا عبور می‌کنند. سلول‌های عبوری توسط رنگ فلورسنت رنگ‌آمیزی و درطول موج ۴۸۰ نانومتر تهییج و نور ساطع شده توسط سیستم فلئورسنت پلیت‌ریدر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. شدت نور به‌دست آمده با تعداد سلول‌های عبوری از غشا متناسب با سلول‌های مهاجم یا متاستاتیک بود.

تجزیه و تحلیل اثر Bovicin HC5 بر بیان ژن‌های آپوپتوزی

میزان بیان ژن پروآپوپتوزی *bax* و ژن آنتی‌آپوپتوزی *bcl-2* در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} از Bovicin HC5، نسبت به ژن مرجع *actin-*□ به کمک روش کمی Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا استخراج RNA از سلول توسط کیت استخراج RNA (پارس‌توس، ایران) و سنتز cDNA با استفاده از کیت (پارس‌توس، ایران) طبق دستورالعمل کیت‌ها انجام شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از ترموسایکلر Rotor-Gene Q (Corbett)، و کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Biotechnology) (به‌صورت ۹۴°C به‌مدت ۱۲ دقیقه، مرحله دوم ۹۴°C به‌مدت ۲۰ ثانیه و ۵۷°C به‌مدت ۴۰ ثانیه و مرحله آخر ۷۲°C به‌مدت ۱۵ دقیقه) در ۳۵ سیکل انجام شد.

حجم نهایی هر میکروتیوپ، ۲۰ میکرولیتر، که حاوی ۱۰ پیکومول از پرایمرهای پیشرو و پیرو مربوط به هر ژن، ۴۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میکرولیتر Master Mix و ۷ میکرولیتر آب RNase free بود. در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با مقایسه نتایج به‌دست آمده از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده محاسبه شد. هر واکنش برای هریک از ژن‌ها ۳ بار انجام شد و از میانگین آن‌ها برای تجزیه و تحلیل استفاده شد.

پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر (*bax* و *bcl-2* و *actin-*□) توسط نرم‌افزار Allele ID طراحی شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه

ژن	پرایمر پیشرو	پرایمر پیرو	قطعه kb
actin-□	5'-'TCACCCACACACTGTTGCCATCTAGA-3'	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'	306
bcl-2	5'- TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3'	5'- CAGGCAGGAGAAATCAAACAGAG-3'	122
bax	5'- TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3'	5'- AGCTTCTTGGTGGACGCATC-3'	101

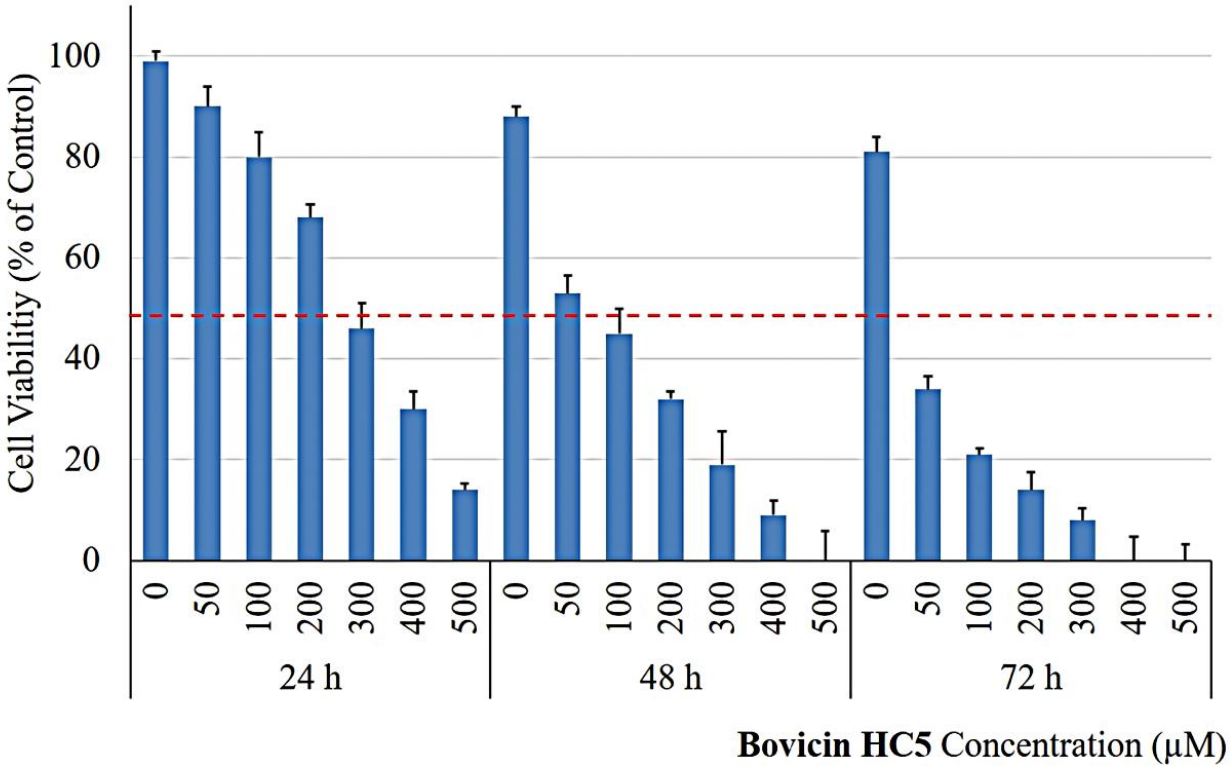
آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه p با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. همچنین، مقادیر $p<۰/۰۵$ در هر تست معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتایج

Bovicin HC5 زنده‌مانی سلول‌های Huh-7 را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داد

اثرات سایتوتوکسیک Bovicin HC5 بر روی سلول‌های Huh-7 به‌روش MTT تعیین شد. نتایج نشان داد که مرگ سلول‌های Huh-7 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف Bovicin HC5 (۵۰ تا ۵۰۰ میکرومولار) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اتفاق افتاد. IC_{50} پری‌بیوتیک Bovicin HC5 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، به ترتیب ۰/۸ و ۰/۳ میکرومولار بود. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، القای مرگ سلولی توسط Bovicin HC5 به‌صورت وابسته به‌زمان با روند خطی افزایش می‌یابد و پس از ۴۸ ساعت به‌حداکثر خود (بیش از ۹۰٪ مرگ سلولی) می‌رسد و همچنان معنی‌دار است.

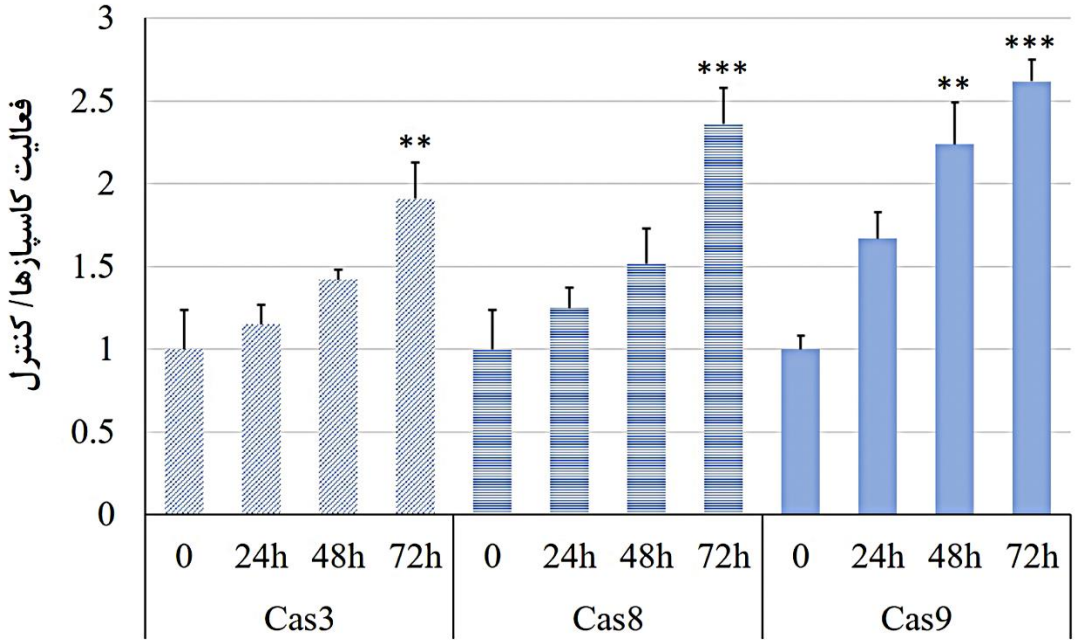


شکل ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی Huh-7 تحت تأثیر Bovicin HC5 با استفاده از روش MTT.

سلول‌ها با دوزهای مختلف Bovicin HC5 (از ۵۰ تا ۵۰۰ میکرومولار) تیمار شدند و به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در ۲۴ ساعت اول، غلظت ۳۰۰ میکرومولار به عنوان IC_{50} انتخاب شد. نوارهای خطا نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه‌گانه است.

اثر Bovicin HC5 در فعال‌سازی کاسپازها و القای آپوپتوز

در سلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت (IC_{50})۳۰۰ میکرومولار Bovicin HC5 فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در مقایسه با فعالیت آن‌ها در گروه کنترل به‌صورت وابسته به‌زمان افزایش داشت. هم‌چنین بیشترین میزان فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ نسبت به کنترل پس از ۷۲ساعت به‌ترتیب ۱/۹۱، ۲/۳۶ و ۲/۶۲ برابر شد.

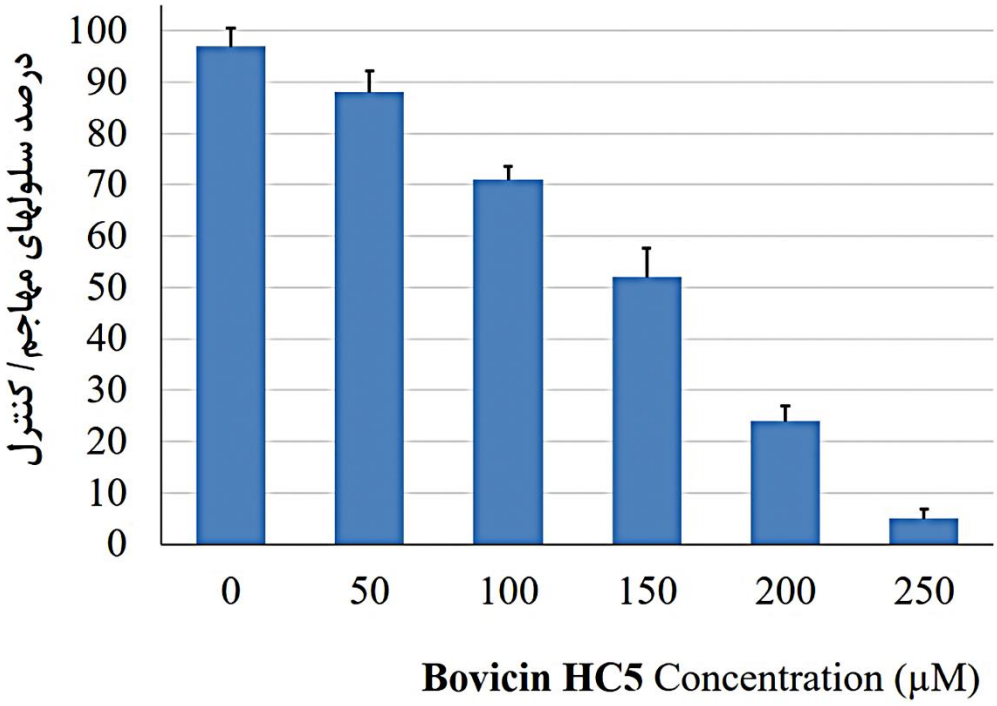


شکل ۲. تأثیر Bovicin HC5 بر فعالیت کاسپازها در Huh-7.

بررسی اثر Bovicin HC5 بر توان تهاجم سلول‌های Huh-7

توان تهاجم نشان دهنده پتانسیل متاستاز سلول‌های سرطانی است که به روش Boyden Chamber بررسی گردید. در این روش شدت نور ثبت شده متناسب با تعداد سلول‌های Huh-7 عبور کرده از غشای پایه است. نتایج نشان می‌دهند که پری‌بیوتیک Bovicin HC5 در غلظت‌های زیرکشنده توان تهاجم سلول‌های Huh-7 را به‌طور وابسته به‌دوز در *In vitro* مهار کرد. به‌طوری‌که در غلظت ۲۵۰µM بدون این‌که بر سلول‌ها اثر کشنده قوی داشته باشد، حداقل توان تهاجم آن‌ها را نشان داد ($p<۰/۰۰۱$).

سلول‌ها باغلظت IC50، Bovicin HC5 به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و۹ درسلول‌های Huh-7 به‌صورت وابسته به‌زمان افزایش داشت. تست تعقیبی توکی، تفاوت معنی‌داری در افزایش میزان فعالیت کاسپازهای ۳ ($p<۰/۰۱$)، کاسپاز ۸ ($p<۰/۰۰۱$) و کاسپاز ۹ ($p<۰/۰۰۱$) در سلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت ۳۰۰ میکرومولار Bovicin HC5 نشان داد. نوارهای خطا نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه‌گانه است. اختلاف آماری با معنی‌داری $p<0.001$*** ، $p<0.01$ **، * $p<0.05$ نشان داده شد.

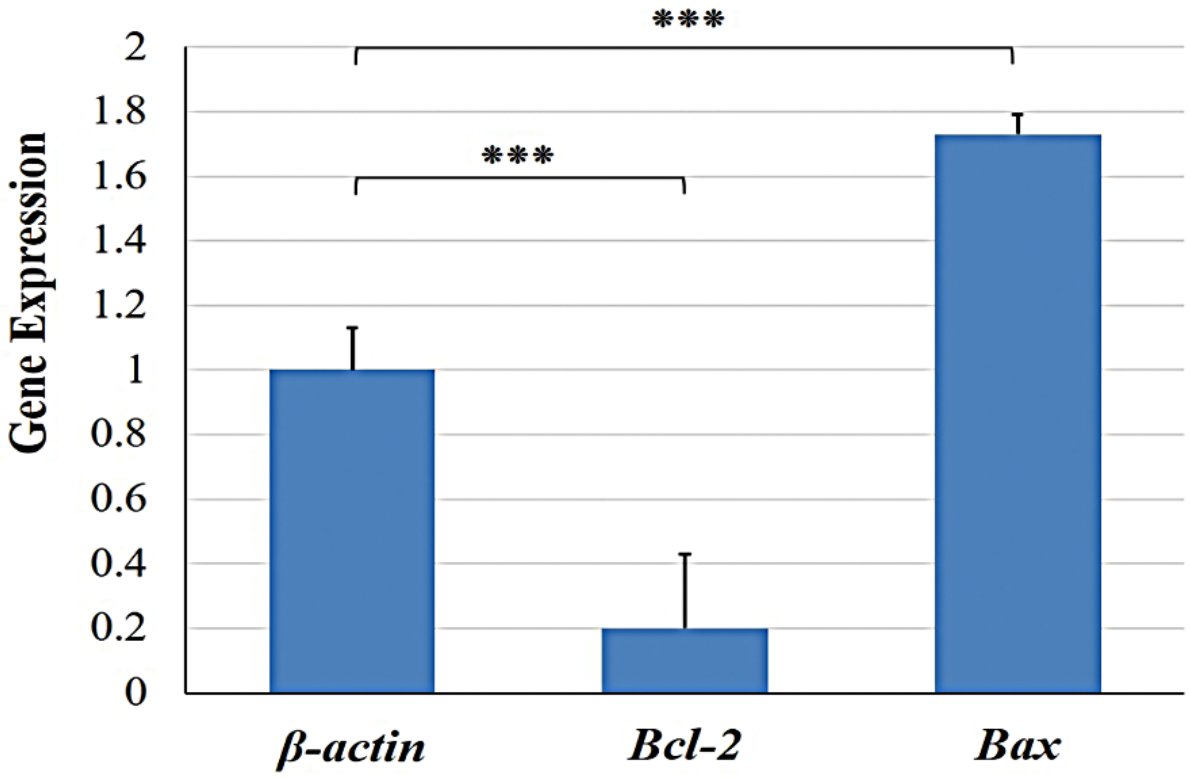


شکل ۳. بررسی اثر Bovicin HC5 بر توان تهاجم سلول‌های Huh-7.

Bovicin HC5 در غلظت‌های زیرکشنده به‌طور قابل توجهی مهاجرت سلول‌های Huh-7 را، بدون اثر سمیت قوی، مهار کرد($p<۰/۰۰۱$). نوارهای خطا نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه‌گانه است.

اثر Bovicin HC5 بر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های Huh-7

اثر Bovicin HC5 با تغییر در بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* در سلول‌های Huh-7 در القای آپوپتوز نقش دارد. تفاوت بیان ژن پروآپوپتوزی *bax* و ژن آنتی‌آپوپتوزی *bcl-2* در سلول‌های Huh-7 تیمار شده با غلظت ۳۰۰µM Bovicin HC5 نسبت به کنترل معنی‌دار بود. دوز IC_{50} پری‌بیوتیک Bovicin HC5 به‌طور قابل توجهی بیان ژن *bax* را حدود ۱/۷۳ برابر در سلول‌های Huh-7 افزایش داد ($p<۰/۰۰۱$). درحالی‌که، بیان *bcl-2* کاهش قابل توجهی حدود ۵ برابر ($p<۰/۰۰۱$) داشت. یافته‌ها به‌صورت مقادیر نرمال شده، تعداد کپی ژن‌های انتخاب شده نسبت به *actin*- اعلام شد.



شکل ۴. بررسی تغییر بیان ژن‌های *bax* و *bcl-2* در سلول‌های Huh-7 توسط Bovicin HC5 به روش RT-qPCR.

Bovicin HC5 بیان ژن پروآپوپتوزی *bax* را درسلول‌های Huh-7 به‌طور قابل‌توجهی و حدود ۱/۷۳ برابر (p<۰/۰۰۱) افزایش داد. درحالی‌که بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی *bcl-2* را حدود ۵ برابر (p<۰/۰۰۱) کاهش داد. نوارهای خطا نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه‌گانه است. اختلاف آماری با معنی‌داری $p<0.001^{***}$ ، ** $p<0.01$، $p<0.05$ * نشان داده شد. نوارهای خطا نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار آزمایش‌های مستقل سه‌گانه است.

بحث

سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان است. جراحی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و درمان هدفمند روش‌های رایجی هستند که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند. انواع مختلفی از شیمی درمانی یا داروهای شیمی درمانی (به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر داروها یا درمان‌ها) برای درمان سرطان استفاده می‌شود. هدف از شیمی درمانی مهار تکثیر سلولی و تکثیر تومور، در نتیجه جلوگیری از تهاجم و متاستاز است.

داروهای شیمی درمانی سنتی اساساً با تأثیر بر سنتز ماکرومولکول‌ها و عملکرد سلول‌های نئوپلاستیک با تداخل در سنتز DNA، RNA یا پروتئین یا تأثیر بر عملکرد مناسب مولکول از پیش ساخته شده عمل می‌کنند. هنگامی که تداخل در سنتز یا عملکرد ماکرومولکولی کافی باشد، به دلیل اثر مستقیم عامل شیمی درمانی یا با تحریک آپوپتوز منجر به مرگ سلولی می شود. مکانیسم‌های سلولی که تکثیر و تمایز سلولی را تقویت یا سرکوب می‌کنند پیچیده هستند و شامل چندین ژن، گیرنده و انتقال سیگنال می‌شوند. تحقیقات در زیست شناسی سلول‌های سرطانی به بینش قابل توجهی در مورد مکانیسم‌های آپوپتوز، رگ‌زایی، متاستاز، انتقال

سیگنال سلولی، تمایز، و مدولاسیون فاکتور رشد منجر شده است (۹).

اگرچه شیمی درمانی مرسوم تا حدی موفق بوده است، اشکالات اصلی شیمی درمانی دسترسی زیستی ضعیف، نیاز به دوز بالا، عوارض جانبی شدید نامطلوب، شاخص‌های درمانی پایین، ایجاد مقاومت دارویی چندگانه و هدف گیری غیراختصاصی آن است. بنابراین، کشف رویکردهای جدید برای درمان سرطان یکی از اهداف اولیه در زمینه بیولوژی سرطان است. از زمان های قدیم استفاده از فرآورده های طبیعی برای درمان بیماری ها یکی از موفق‌ترین راهکارها بوده است.

بسیاری از محصولات طبیعی (NP) نشان داده‌اند که پتانسیل پیشگیری از سرطان و درمان با حداقل عوارض جانبی را دارند. همچنین استفاده از محصولات طبیعی در درمان سرطان می‌تواند اثرات نامطلوب روش سنتی مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی را کاهش دهند. تعداد زیادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت دارای خواص ضدسرطانی هستند، اما تنها تعداد کمی از محصولات طبیعی مانند کمپتوتسین‌ها، آلکالوئیدهای وینکا، تاکسان‌ها و پودوفیلوتوکسین به‌عنوان عوامل ضدسرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند و به صورت تجاری در بازار موجود هستند. بنابراین، نیاز مبرمی به یافتن عوامل ضدسرطان جدید مؤثرتر با کمترین عوارض وجود دارد. شواهد موجود و همچنین نتایج امیدوارکننده استفاده از باکتری‌ها به‌عنوان عوامل ضدسرطانی بر روی رده‌های سلولی متعدد سرطانی توجه دانشمندان را به نقش درمانی باکتری‌ها در زمینه درمان سرطان جلب کرده است.

پروتئین‌ها و پپتیدهای باکتریایی منحصربه‌فردی به‌نام‌های باکتریوسین‌ها ازجمله کولیسین، پیوسین، نایسین، میکروسین، پدیوسین، لاتروسپورولین، پلانتاریسین، دوراماسین و غیره توسط باکتری‌های گرم مثبت (مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) یا گرم منفی (مانند *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*) سنتز می‌شوند، درسال ۲۰۱۹، Rodrigues و همکاران بررسی شد و خواص ضدمیکروبی و ضدسرطانی *in vitro* و *in vivo* آن‌ها نشان داده شد (۱۰). در سال ۲۰۱۱، Villarante و همکاران نشان دادند که Pediocin PA-1 تولید شده توسط باکتری *P. acidilactici K2a2-3* برای سلول‌های HT29 و HeLa آدنوکارسینوم کولون انسان سایتوتوکسیک است (۱۱). در همان سال Kumar و همکاران مشاهده کردند که pediocin CP2 تولید شده توسط باکتری *P. acidilactici CP2 MTCC501* دارای فعالیت ضدتوموری بر روی سلول‌های سرطانی انسانی HEPg2، HeLa و MCF-7 است (۱۲). در مطالعه Varas و همکارانش (۲۰۲۰)، پپتید ضدمیکروبی میکروسین E492 تولید شده توسط باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه، در *in vitro* و *in vivo* خواص ضدسرطانی در برابر سلول‌های سرطان روده بزرگ نشان داد (۱۳).

استرپتوکوکوس بوویس HC5 متابولیت ثانویه Bovicin HC5 را تولید می‌کند که یک لانتی‌بیوتیک (یک کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی چندحلقه‌ای است که حاوی اسیدهای‌آمینه تیواتر لانتیونین یا متیل لانتیونین است) با شباهت‌های ساختاری و عملکردی به معروف ترین باکتریوسین، نایسین است (۸). مطالعات نشان داده‌اند که Bovicin HC5 در برابر باکتری‌های مضر کشاورزی مؤثر است و همچنین رشد گونه‌های باکتریایی را که برای تخمیر علف و استفاده از پروتئین در شکمبه گاو مضرند را مهار می‌کند(۱۴, ۱۵). بسیاری از پپتیدهای ضدمیکروبی، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های نوع A، مانند نایسین غشای سلولی باکتری را هدف قرار می‌دهند (۱۶).

در سال ۲۰۱۲، Paiva و همکاران توانایی سایتوتوکسیک Bovicin HC5 را در آزمایشگاه بررسی نمودند (۱۷). سه رده سلولی یوکاریوتی جداگانه با استفاده از روش MTT برای اندازه‌گیری سمیت سلولی Nisin (به‌عنوان پپتید مرجع) یا Bovicin HC5 مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقادیر IC_{50} Nisin در برابر سلول‌های MCF-7 HepG2 و Vero به‌ترتیب حدود ۱۰۵/۵، ۱۱۲/۵ و ۱۳/۵ میکرومولار بود. درحالی‌که این مقادیر IC_{50} برای Bovicin HC5 در برابر سلول‌های

MCF-7 HepG2 و Vero به‌ترتیب ۲۸۹۰/۵، ۲۷۹/۵ و ۶۵/۵ میکرومولار بود. در حداکثر دوز آزمایش شده Bovicin HC5 (۳۵۰ میکرومولار)، زنده ماندن رده سلولی کمتر از ۲۰٪ بود. Nisin همیشه فعالیت سایتوتوکسیک بیشتری در برابر سلول‌های یوکاریوتی در مقایسه با Bovicin HC5 دارد (۱۷). در این پژوهش، اثرات سایتوتوکسیک Bovicin HC5 بر روی سلول‌های Huh-7 از طریق روش MTT در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. همسو با مطالعات Paiva و همکاران، IC_{50} برای Bovicin HC5 برسلول‌ها پس از ۲۴ ساعت حدود ۳۰۰ میکرومولار بود که مرگ سلولی را به‌صورت وابسته به غلظت و زمان با روند خطی القاء کرد و پس از ۷۲ ساعت به حداکثر خود و کمتر از ۲۰٪ رسید.

کاسپاز (آبشار) گروهی از پروتئازهای آسپارتات می‌باشند که دارای سیستئین هستند و در آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) نقش اصلی را ایفا می‌کنند. آن‌ها به‌عنوان کلیدهای مرگ سلولی شناخته می‌شوند و همدیگر را به‌صورت متوالی فعال و غیرفعال می‌کنند (۱۸). آبشار آپوپتوز کلاسیک از طریق دو مسیر فعال می‌شود: یک مسیر بیرونی که با فعال شدن یک مسیر سیگنالینگ پروکاسپاز۸ به کاسپاز۸ فعال تبدیل می‌شود. کاسپاز۸ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی شده و در نتیجه فرایند آپوپتوز صورت می‌گیرد. در مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی کاسپاز آغازگر کاسپاز۹ می‌باشد. کاسپاز ۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی (۳ و ۶ و ۷) شده و آپوپتوز اتفاق می‌افتد(۱۸). درسال ۲۰۱۲، Paiva و همکاران نشان دادند که Bovicin HC5 (۲/۴ کیلو دالتون) یک پپتید ضدمیکروبی وسیع الطیف تولید شده توسط *S. bovis HC5* است. Bovicin HC5 نسبت به رده‌های سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) و سرطان کبد انسان (HepG2) به‌روشی وابسته به غلظت سمیت سلولی نشان می‌دهد (۱۲). در سال ۲۰۱۱، Chung و همکاران متوجه شدند که پری‌بیوتیک اینولین می‌تواند باعث مهار *bcl-2*، فعال‌شدن کاسپازها و آپوپتوز سلول‌های دندریتیک شود (۲۰). درسال ۲۰۲۱، Juszczak و همکاران تأیید کردند که تیمار رده سلولی C32 با µg/ml ۹۵/۱ پری‌بیوتیک لوتئولین به‌مدت ۲۴ ساعت باعث القای آپوپتوز به‌واسطه فعال شدن کاسپازهای ۸، ۹، ۱۰ و ۳ می‌شود (۲۱). تحقیق حاضر با بررسی آپوپتوز سلول‌ها و سنجش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ نشان داد که تیمار سلول‌های Huh-7 با Bovicin HC5 ۳۰۰µM پس از ۷۲ ساعت، فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ را به‌ترتیب ۱/۹۱، ۲/۳۶ و ۲/۶۲ برابر افزایش داد. پری‌بیوتیک Bovicin HC5 می‌تواند بر رده سلولی سرطانی Huh-7 اثر سایتوتوکسیک داشته باشد که حداقل بخشی از این اثر از طریق افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ میانجی‌گری می‌شود. به‌طوری‌که با تغییر در نسبت *bax/bcl-2* ، کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ را افزایش می‌دهد و باعث القای آپوپتوز از طریق راه‌اندازی آبشار کاسپازها می‌شود.

مهمترین علت مرگ و میر بیماران مبتلا به تومورهای جامد، تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی یا متاستاز است (۱۹). در سال ۲۰۲۱ و همکاران Po-Chung اثر ضدتهاجمی Kaempferol (فلاوونوئید) بر روی دو رده سلولی کارسینوم هپاتوسلولار انسانی (Huh-7 و SK-Hep-1) با روش Boyden Chamber مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش دادند که Kaempferol تهاجم و مهاجرت سلول‌های Huh-7 و SK-Hep-1 را کاهش داد (۲۰). در مطالعه Escamilla و همکاران (۲۰۱۲) توانایی سوپرناتانت‌های بدون سلول (CFS) باکتری‌های پروبیوتیک *L. casei* و *LGG* برای کاهش تهاجم سلول‌های سرطانی کولون از طریق Boyden Chamber پوشش داده شده با ماتریژل با استفاده از سلول‌های سرطان کولورکتال انسانی HCT-116 تعیین شد. تیمار سلول‌های HCT-116 با CFS به‌دست آمده از *L. casei* به‌طور قابل توجهی تهاجم سلولی را به‌حدود ۳۰٪ (P =۰/۰۴) نسبت به کنترل کاهش داد. همچنین، CFS به دست آمده از *LGG* نیز به‌طور قابل توجهی تهاجم سلولی را حدود ۵۰٪ (P =۰/۰۱) نسبت به کنترل کاهش داد (۲۱). در این تحقیق، پتانسیل ضدتهاجمی Bovicin HC5 برای جلوگیری از متاستاز تومور در شرایط آزمایشگاهی در رده سلولی Huh-7

انسانی توسط تست Boyden Chamber، بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده، پری‌بیوتیک Bovicin HC5 در غلظت‌های زیرکشنده (از۰ تا ۲۵۰µM) توان تهاجم سلول‌های Huh-7 را به‌طور وابسته به‌دوز در *In vitro* مهار کرد. به‌طوری‌که در غلظت ۲۵۰ µM با حداقل اثر کشندگی، توان تهاجم را تا ۹۰٪ کاهش داد (p<۰/۰۰۱).

ژن‌های پروآپوپتوتیک *bax* و آنتی‌آپوپتوتیک *bcl-2* به‌عنوان نشانگرهای زیستی آپوپتوز محسوب می‌شوند. در فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی تعادل بین *bax* و *bcl-2* حیاتی است و عدم تعادل می‌تواند منجر به آپوپتوز شود. الگوی بیان *bax*، *bcl-2* و نسبت آن‌ها نه‌تنها بین سرطان‌های مختلف، بلکه حتی در یک سرطان متفاوت است (۲۲). تحقیقات مختلف نشان داده اند که تغییر بیان برخی از ژن‌ها با القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، تکثیر آن‌ها را محدود می‌کند (۲۳). در سال ۲۰۱۱ ، Chung و همکاران نشان دادند که پری‌بیوتیک اینولین با تغییر نسبت *bax/bcl-2* و فعال سازی مسیر وابسته به کاسپاز، آپوپتوز سلول‌های دندریتیک را القا می‌کند (۲۴). مطالعه احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که پری‌بیوتیک شناخته شده Nisin بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال اثرات سایتوتوکسیک نشان می‌دهد. تأثیر سایتوتوکسیک Nisin از طریق مسیر آپوپتوز ذاتی انجام می‌شود و قادر است شاخص آپوپتوز (*bax/bcl-2*) را در سلول‌های سرطانی افزایش دهد (۲۵). همسو با چنین نتایجی، یافته‌های ما از بررسی ژن‌های آپوپتوز نشان داد که به‌دنبال تیمار سلول‌های سرطانی Huh-7 با دوز IC_{50} از Bovicin HC5، بیان بالای ژن *bax* و تحریک آپوپتوز، تکثیر آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین با کاهش بیان ژن *bcl-2* و مهار آنتی‌آپوپتوز، مرگ سلولی افزایش می‌یابد. Bovicin HC5 می‌تواند موجب حدود ۱/۷ برابر افزایش بیان معنی‌دار ژن *bax* (p<۰/۰۰۱) و کاهش قابل‌توجه بیان ژن *bcl-2* حدود ۵ برابر (p<۰/۰۰۱) در سلول‌های Huh-7 شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پری‌بیوتیک Bovicin HC5با القای آپوپتوز، جلوگیری از مهاجرت و مهار تهاجم سلول‌های سرطانی Huh-7، پتانسیل درمان سرطان کارسینوم هپاتوسلولار را در *In vitro* دارد. لذا Bovicin HC5 ممکن است به دلیل عدم سمیت برای سلول‌های نرمال، برای مهار متاستاز سلول‌های سرطانی و تحقیقات بیشتر در *In vivo* نیز مناسب باشد. این پری‌بیوتیک ممکن است نوید بخش کشف یک استراتژی جدید برای درمان کارسینوم هپاتوسلولار انسانی بوده و داروی جدیدی با فعالیت ضدتومور و ضدمتاستاتیک و بدون عوارض جانبی تولید گردد.

References

1. Grajek W, Olejnik A, Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta biochimica Polonica. 2005;52(3):665-71.
2. Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. The Journal of nutrition. 2000;130(2):410S-4S.
3. de LeBlanc AdM, Perdigón G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. Medical Science Monitor. 2004;10(4):BR96-BR104.
4. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2):361s-4s.
5. Javanmard A, Ashtari S, Sabet B, Davoodi SH, Rostami-Nejad M, Akbari ME, et al. Probiotics and their role in gastrointestinal cancers prevention and treatment; an overview. Gastroenterology and hepatology from bed to bench. 2018;11(4):284.
6. Agil R, Hosseinian F. Dual functionality of triticale as a novel dietary source of prebiotics with antioxidant activity in fermented dairy products. Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands). 2012;67(1):88-93.10.1007/s11130-012-0276-2.
7. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. Current issues in intestinal microbiology. 2000;1(1):13-24.
8. Mantovani HC, Hu H, Worobo RW, Russell JB. Bovicin HC5, a bacteriocin from Streptococcus bovis HC5. Microbiology. 2002;148(11):3347-52.

9. Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. Journal of Clinical Oncology. 2005;23(23):5386-403.
10. Rodrigues G, Silva GGO, Buccini DF, Duque HM, Dias SC, Franco OL. Bacterial proteinaceous compounds with multiple activities toward cancers and microbial infection. Frontiers in microbiology. 2019;10:1690.
11. Villarante KI, Elegado FB, Iwatani S, Zendo T, Sonomoto K, de Guzman EE. Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from Pediococcus acidilactici K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011;27(4):975-80.
12. Kumar B, Balgir PP, Kaur B, Garg N. Cloning and expression of bacteriocins of Pediococcus spp.: A review. Archives of Clinical Microbiology. 2011;2(3):0-.
13. Varas MA, Muñoz-Montecinos C, Kallens V, Simon V, Allende ML, Marcoleta AE, et al. Exploiting zebrafish xenografts for testing the in vivo antitumorigenic activity of microcin E492 against human colorectal cancer cells. Frontiers in microbiology. 2020;11:405.
14. Mantovani HC, Russell JB. Inhibition of Listeria monocytogenes by bovicin HC5, a bacteriocin produced by Streptococcus bovis HC5. International journal of food microbiology. 2003;89(1):77-83.
15. Lima JR, Ribon AdOB, Russell JB, Mantovani HC. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. FEMS microbiology letters. 2009;292(1):78-84.
16. Breukink E, van Heusden HE, Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S, et al. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(22):19898-903.
17. Paiva AD, de Oliveira MD, de Paula SO, Baracat-Pereira MC, Breukink E, Mantovani HC. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. Microbiology. 2012;158(11):2851-8.
18. Ochiiwa H, Ailiken G, Yokoyama M, Yamagata K, Nagano H, Yoshimura C, et al. TAS4464, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, activates both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways via c-Myc-mediated regulation in acute myeloid leukemia. Oncogene. 2021;40(7):1217-30.
19. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020;5(1):28.10.1038/s41392-020-0134-x.
20. Ju P-C, Ho Y-C, Chen P-N, Lee H-L, Lai S-Y, Yang S-F, et al. Kaempferol inhibits the cell migration of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing MMP-9 and Akt signaling. Environmental Toxicology. 2021;36(10):1981-9.https://doi.org/10.1002/tox.23316.
21. Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic Lactobacillus casei and Lactobacillus rhamnosus GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. Nutrition and cancer. 2012;64(6):871-8.
22. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death & Disease. 2019;10(3):177.10.1038/s41419-019-1407-6.
23. Webster MR, Fane ME, Alicea GM, Basu S, Kossenkov AV, Marino GE, et al. Paradoxical role for wild-type p53 in driving therapy resistance in melanoma. Molecular cell. 2020;77(3):633-44. e5.
24. Chung J, Yoon Y-O, Lee JS, Ha TK, Ryu SM, Kim KH, et al. Inulin induces dendritic cells apoptosis through the caspase-dependent pathway and mitochondrial dysfunction. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2011;34(4):495-500.
25. Ahmadi S, Ghollasi M, Hosseini HM. The apoptotic impact of nisin as a potent bacteriocin on the colon cancer cells. Microbial Pathogenesis. 2017;111:193-7.https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.037.

Original Article

Investigating the anticancer effect of the lantibiotic, Bovicin HC5

Received: 08/08/2022 - Accepted: 16/10/2022

Sheyda Bouzari[1]
Ronak Bakhtiari[2*]
Hatef Ajoudanifar[3]
Seyed ataollah Sadat shandiz[4]

[1] Department of Biology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[2] Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Department of Biology, Damghan Branch,Islamic Azad University,Damghan ,Iran.
[4] Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran

Email:
bakhtiarironak80@gmail.com

Abstract
Cancer chemotherapy is a big challenge due to the adverse effects of anticancer drugs. Therefore, the effort is to use natural products with therapeutic and safe potential to treat all kinds of diseases. This research aims to discover the anticancer potential of the prebiotic Bovicin HC5. The survival rate of Huh-7 human hepatocellular carcinoma cells after treatment with different concentrations of Bovicin HC5 was investigated by MTT assay. Assays of caspase 3, 8, and 9 activities in Huh-7 cancer cells treated with the Bovicin HC5 IC50 concentration were conducted to determine the degree of cell apoptosis. Boyden Chambers were used to assessing Huh-7 cancer cells' invasion ability after being treated with sublethal doses of Bovicin HC5. Using specific primers and the Real-Time PCR method, proapoptotic bax and antiapoptotic bcl-2 expression levels in Huh-7 cells treated with the Bovicin HC5 IC50 concentration were quantified. ANOVA statistical test was used to analyze the data ($p<0.05$). The results of the MTT test showed that the viability of Huh-7 cells treated with different concentrations of Bovicin HC5 decreased significantly depending on the concentration and treatment time ($p<0.001$). As a result, a 400 µM concentration and 72-hour duration resulted in the greatest effects. The IC50 concentration of Bovicin HC5 was determined to be 300 µM. The activity of caspases 3, 8, and 9 in treated Huh-7 cells increased significantly after 72 hours in a time-dependent manner and compared to the control by about 1.9 times ($p<0.01$), and 2.36 times ($p<0.01$) and 2.62 times ($p<0.001$).
Key Words: human hepatocellular carcinoma, prebiotic, Bovicin HC5, antimetastasis, apoptosis
Acknowledgement: There is no conflict of interest