مطالعه اثر ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها بر میزان پروتئین جهش‌یافته p53 در رده سلولی K562

ملیحه ریکی*[1]، امیر توکمه‌چی[2]، فرح فرخی[3]

۱- کارشناسی ارشد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۴ / زمستان ۹۵ / مسلسل ۷۰

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۷/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۲

مقدمه: پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های گوناگونی تعریف می‌شوند که دارای اثرات مفید در جلوگیری و درمان شرایط پاتولوژیک ویژه هستند. لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی، پروبیوتیک‌هایی هستند که می‌توانند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القاء کنند. لوسمی میلوییدی مزمن از شایع‌ترین بدخیمی‌های بدن محسوب می‌شود. بیان پروتئین‌های جهش‌یافته p53 در رده‌های سرطانی، مقاومت در مقابل آپوپتوز را افزایش می‌دهند. بنابراین هدف از بررسی حاضر، ارزیابی تأثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی این پروبیوتیک‌ها بر میزان پروتئین جهش‌یافته p53 در رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: برای این منظور ابتدا باکتری‌ها کشت داده شد، سپس به کمک دستگاه سونیکاتور خرد و درنهایت دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی آنها جدا شدند. در مرحله بعد غلظت‌های مختلفی از دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی تهیه شدند. سپس میزان پروتئین p53 در سلول‌های تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی، به روش الایزا سنجیده شد.

یافته‌ها: یافته‌های حاصل از آزمون الایزا نشان دادند، عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی باعث کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) سطح پروتئین حاصل از ژن جهش‌یافته p53 نسبت به گروه شاهد می‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، بین کاهش میزان پروتئین p53 و القاء آپوپتوز در سلول‌ها با ژن p53 جهش‌یافته رابطه وجود دارد که این می‌تواند راهی برای درمان هدفمند سرطان ارائه کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین p53، رده سرطانی K562، لاکتوباسیلوس کازیی، لاکتوباسیلوس پاراکازیی.

*آدرس مکاتبه : ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: malihe.riki@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

مقدمه

آپوپتوزیس فرایندی بیولوژیک است که به‌شدت توسط برنامه خودکشی کدگذاری شده‌ای تنظیم می‌گردد که مستلزم تنظیم هماهنگ ژن‌های اختصاصی است (۱). چندین ویژگی مورفولوژیکی، مشخص‌کننده آپوپتوزیس می‌باشند. این ویژگی‌ها شامل چروکیدگی سلول، متراکم شدن کروماتین، تجزیه DNA در فواصل بین نوکلئوزومی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک می‌باشد (۲). ضرورت آپوپتوزیس در ارگانیسم‌های پرسلولی به‌طور گسترده‌ای مورد توجه است. این فرایند برای هموستاز سلولی موردنیاز بوده و در موارد پاتولوژیکی مانند سرطان، اختلالاتی در تنظیم آپوپتوزیس رخ می‌دهد (۳).

سرطان به‌وسیله یک‌سری جهش‌های متوالی در ژن‌های انسان اتفاق می‌افتد و هر جهش هم تا حدی تغییرات جدیدی را در سلول ایجاد می‌نماید (۴). p53 یک ژن بازدارنده تومور می‌باشد که به‌واسطه جهش یا حذف شدن، تقریباً در پنجاه درصد از سرطان‌های بدخیم انسان غیرفعال شده است (۵). در حالت طبیعی به هنگام بروز صدمه در DNA، ژن‌های سرکوبگر تومور مانند ژن p53، فعال شده و میزان بیان آن افزایش می‌یابد. پروتئین p53 حاصل از بیان این ژن که پروتئین توموری (TP53) نیز نامیده می‌شود، تنظیم‌کننده چرخه سلولی بوده و می‌توان آن را متوقف کننده تومور نامید (۶،۷). میزان پروتئین p53 در سلول‌های طبیعی کم و به‌طور پیوسته تولید و تخریب می‌شود. این پروتئین به ژن‌هایی که بازسازی DNA را تنظیم می‌کنند، متصل شده و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را کنترل می‌کند (۹،۸). بدین صورت که ژن p53 در حالت طبیعی به سلولی که DNA آن دچار آسیب شده باشد، فرمان توقف تکثیر می‌دهد تا آسیب وارده را اصلاح نماید و اگر سلول نتواند آسیب وارده را اصلاح نماید، فرمان آپوپتوزیس را صادر می‌کند.

بنابراین، اگر ژن p53 آسیب ببیند و عملکردش مختل شود، سلول آسیب دیده به تکثیر خود ادامه می‌دهد و سلول های غیرطبیعی بیشتری ایجاد می‌نماید (۱۰،۱۱). فراورده پروتئینی ایجاد شده توسط ژن جهش‌یافته p53، دارای نیمه عمر طولانی می‌باشد که به اندازه کافی در داخل هسته سلول تجمع می‌یابد. این ژن جهش‌یافته در سرطان‌هایی مانند لوسمی، مثانه، آستروسیتوما، انواع سارکوما و مزوتلیوما دیده می‌شود (۱۲).

لوسمی میلوییدی مزمن (CML) بیماری کلونال سلول‌های بنیادی چندتوان است که حاصل جابه‌جایی دوطرفه کروموزومی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد (۱۳). این جابه‌جایی کروموزومی باعث به وجود آمدن ژن هیبرید BCR-ABL می‌شود که پروتئین P210BCR-ABL را کد می‌کند و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و نقص در فرایند آپوپتوزیس می‌گردد (۱۴). بیشتر مطالعات در زمینه لوسمی میلوییدی به حالت برون تنی محدود می‌گردد. چندین رده سلولی از بیمارانی با لوسمی میلوییدی تهیه و شناسایی شده است که یکی از آن‌ها رده سلولی K562 می‌باشد (۱۵).

لاو و همکاران در سال ۱۹۹۳ توالی ژن p53 را در رده سرطانی K562 مشخص نمودند. این محققان نشان دادند که ژن p53 این رده سلولی، در اگزون ۵ خود با وارد شدن یک سیتوزین بین کدون‌های ۱۳۵ و ۱۳۶ دچار جهش شده است. این جهش منجر به ایجاد پروتئین ۱۴۷ اسیدآمینه‌ای می‌شود که انتهای N آن ناقص است (۱۶). همچنین یوزودا و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که رده سلولی لوسمی K562، نوع وحشی پروتئین p53 را بیان نمی‌کند و فاقد عملکرد طبیعی می‌باشد (۱۷).

ازجمله راهکارهای درمانی که تاکنون برای درمان CML به کار گرفته شده، می‌توان به شیمی‌درمانی، پیوند مغز استخوان، درمان با اینترفرون آلفا و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد (۱۸). ولی وجود مقاومت دارویی مانع اصلی در بهبود این بیماران با روش‌های درمانی فوق ذکر شده است (۱۹،۲۰).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده هستند که در صورت مصرف به میزان مشخص، اثرات مفیدی در سلامت مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کنند. باکتری‌های لاکتوباسیلوس، بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها ازجمله لاکتوباسیلوس‌ها، باعث مهار رشد بسیاری از انواع سلول‌های پاتولوژیک می‌گردند. این گروه از باکتری‌ها که به‌عنوان پروبیوتیک مطرح شده‌اند، باعث افزایش پاسخ ایمنی میزبان شده و همچنین اثرات پیشگیری کننده در ابتلا به سرطان و نیز مهارکنندگی در رشد تومور سرطانی دارند (۲۱).

یافته‌های به دست آمده از مطالعات نشان می‌دهند که اجزای سلولی لاکتوباسیلوس‌ها شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط حرارت، دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان و عصاره سیتوپلاسمی دارای عملکردهای متفاوتی به هنگام مجاور شدن با سلول‌های سرطانی هستند (۲۲). هم‌چنین، مطالعات نشان می‌دهند، لاکتوباسیلوس روتری باعث القاء ترشح عواملی می‌شود که سبب آپوپتوزیس در سلول‌های لوسمی میلوییدی می‌گردد (۲۳). بر اساس مطالعات انجام گرفته توسط کبیری و همکاران، مشخص شد که عصاره‌های سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی جدا شده از ماهی کپور در مقایسه با گروه شاهد که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) دارای فعالیت سلول‌کشی در رده سرطانی K562 هستند (۲۴). از طرفی، مطالعات انجام گرفته توسط ریکی و همکاران، نشان داد که دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی نیز باعث القاء مرگ سلول‌های سرطانی K562 می‌گردد (۲۵).

از آنجایی‌که دانش بشری به جایگاه قابل قبولی در درمان سرطان‌های لوسمی دست نیافته است، لذا تلاش در جهت بکارگیری داروهایی با پتانسیل بالا که آثار سوء داروهای شیمی درمانی را نداشته باشند و بتوانند در درمان سلول‌های سرطانی مؤثر واقع شوند، ادامه دارد. با توجه به اثبات خواص ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها، در این تحقیق برای مشاهده تأثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی بر میزان پروتئین p53 در رده سرطانی K562، از روش الایزا استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور (C122) تهیه و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت 1640 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (گیبکو، انگلستان)، در حضور ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (گیبکو، انگلستان)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (شرکت سیگما) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (شرکت سیگما) در انکوباتور با ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد تا حدود ۸۰٪ سطح فلاسک، از فلاسک جدا، شمارش و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت باکتری‌ها و تهیه دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی آنها

لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی جدا شده از روده ماهی کپور معمولی، از کلکسیون میکروارگانیسم آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه بدست آمدند (۲۶). هر کدام از باکتری‌ها به‌صورت جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS (deMan Rogosa Sharpe) (مرک، آلمان) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰°C کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شدند. سپس باکتری‌ها به روش Freez-Thaw لیز شدند. در مرحله بعد، عمل خرد کردن باکتری‌ها در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (تومی، ژاپن) انجام گرفت. در انتها

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴°C با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی به‌عنوان عصاره سیتوپلاسمی جدا شده و رسوب حاصل نیز به‌عنوان دیواره سلولی جدا گردید. سپس دیواره‌ها به مدت یک شبانه‌روز داخل دستگاه انجماد خشک (چست، آلمان) قرار داده شد تا خشک شوند.

در این تحقیق برای تهیه غلظت‌های مختلف از دیواره مقادیر موردنیاز وزن شده و جهت استریل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو شدند. در نهایت، عمل رقیق سازی دیواره‌ها توسط محیط کشت RPMI انجام گرفت و رقت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دیواره باکتری‌ها در شرایط استریل تهیه شد. هم‌چنین در مورد عصاره سیتوپلاسمی پس از سنجش میزان پروتئین در عصاره سیتوپلاسمی، با روش برادفورد، بر اساس میزان پروتئین، رقت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون استریل شدند. رقت-های تهیه شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

آزمایش سنجش میزان پروتئین p53 سلول‌های K562 به روش الایزا

برای سنجش میزان پروتئین p53 سلول‌های K562، ابتدا سلول‌های سرطانی به تعداد ۱۰×۱۰^{۶} و با حجم نهایی ۱۵ میلی‌لیتر در فلاسک‌های فیلتردار $۷۵cm^{2}$ کشت داده شدند و در ادامه، با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دیواره‌های سلولی لاکتوباسیلوس-های کازیی و پاراکازیی و غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌های سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس‌ها، مجاور شدند. سپس سلول‌های K562 تیمارشده، به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، سلول‌های تیمار شده، دو بار به‌وسیله PBS (Phosphate Buffer Saline) سرد با pH=۷/۲-۷/۴ شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها با دور rpm ۲۰۰۰ و دمای ۴°C سانتریفوژ گردیدند. درنهایت طبق دستور کیت الایزا (Human P53 ELISA KIT) (کازبی‌او، چین)، به رسوب حاصله ۱۰۰µl، PBS سرد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک شب در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. جهت انجام عمل لیز کردن سلول‌های تیمار شده، از روش Freez-Thaw استفاده شد و این سیکل چهار بار تکرار گردید. سلول‌های لیز شده، در دمای ۸°C-۲ با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند.

مایع رویی به‌عنوان عصاره سیتوپلاسمی حاوی پروتئین-های سلولی برای ذخیره‌سازی به فریزر ۲۰°C- انتقال یافت و تا زمان استفاده برای انجام تست الایزا نگهداری شدند. در این آزمایش، برای سنجش میزان پروتئین p53، از روش الایزای ساندویچ استفاده شد. ابتدا طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، معرف‌ها و استانداردها آماده شدند.

در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده به عنوان عصاره سیتوپلاسمی سلول‌های K562 که تحت تیمار قرار گرفته بودند به خانه‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید. میکروپلیت تعبیه شده در کیت مورد استفاده، حاوی خانه‌هایی بوده که با آنتی‌بادی‌های مخصوص پروتئین p53 پوشیده شده است. لذا برای انجام واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C انکوباتور، نگهداری شد. پس از طی این زمان، مایع موجود، از خانه‌های میکروپلیت برداشته شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی آنتی‌بادی‌های مخصوص پروتئین p53 که توسط بیوتین نشاندار شده‌اند به هر خانه اضافه شد.

میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. بعد از این مدت با استفاده از بافر، سه بار شستشو انجام گرفت. در مرحله بعد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی آویدین متصل شده به آنزیم HRP (Horse Radish Peroxidase) به خانه‌های حاوی نمونه اضافه گردید و یک ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. دوباره عمل شستشو مانند مرحله قبل انجام گرفت.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

سپس ۹۰ میکرولیتر از محلول حاوی TMB (Tetra Methyle Benzidine) به‌عنوان سوبسترا (بستر) به هر خانه اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷°C به دور از نور انکوبه شد.

پس از این زمان خانه‌هایی که حاوی پروتئین p53 بودند، دچار تغییر رنگ شدند. برای اتمام واکنش بین آنزیم و سوبسترا از اسید سولفوریک استفاده گردید. در انتها توسط دستگاه الایزا ریدر (استات فاکس، آمریکا)، OD نمونه‌ها با طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و درنهایت غلظت نمونه‌ها با توجه به استانداردهای سنجیده شده بر اساس دستورالعمل کیت، برحسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA نرم‌افزار SPSS ۲۱ و آزمون Tukey's (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری آزمون‌ها P<۰/۰۵ بود.

یافته‌ها

یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیی و لاکتوباسیلوس پاراکازیی، در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) سبب کاهش میزان پروتئین p53 در تمام غلظت‌ها و زمان‌ها گردید. هم‌چنین بر اساس این نتایج می‌توان گفت که تغییرات میزان پروتئین p53 با افزایش زمان و غلظت معنی‌دار نمی‌باشد. این امر در تمامی تیمارهای سلول‌های سرطانی با دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیی (جدول ۱)، لاکتوباسیلوس پاراکازیی (جدول ۲) و عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی (جدول ۳)، بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صادق است.

جدول ۱. مقایسه میزان p53 (pg/ml) پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان	غلظت دیواره (µg/ml)			
	شاهد	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰
۲۴	۶/۶۹±۰/۱۴*	۴/۵۶±۰/۱۳	/۵۱±۰/۰۴ ۴	۴/۶۴±۰/۱۴
۴۸	۶/۸۷±۰/۱۸*	۴/۴۲±۰/۶۲	/۳۲±۰/۱۳ ۴	۴/۰۹±۰/۰۷
۷۲	۷/۱۲±۰/۱۵*	/۲۲±۰/۰۱ ۴	۴/۱۹±۰/۳۶	۳/۹±۰/۵۶

داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation بیان شده‌اند.
*نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۲. مقایسه میزان p53 (pg/ml) پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دیواره سلولی لاکتوباسیلوس پاراکازیی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان	غلظت دیواره (µg/ml)			
	شاهد	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰
۲۴	۶/۶۹±۰/۱۴*	۴/۵۸±۰/۰۶	/۴۹±۰/۰۷ ۴	۴/۶۹±۰/۳۹
۴۸	۶/۸۷±۰/۱۸*	۴/۴۸±۰/۷	۴/۴۶±۰/۰۸	۴/۳۷±۰/۲۲
۷۲	۷/۱۲±۰/۱۵*	/۱۳±۰/۰۵ ۴	۴/۱۱±۰/۰۶	۳/۸±۰/۵۱

داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation بیان شده‌اند.
*نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۳. مقایسه میزان پروتئین p53 (pg/ml) پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

باکتری	زمان		
	۲۴	۴۸	۷۲
شاهد	۶/۶۹±۰/۱۴*	۶/۸۷±۰/۱۸*	۷/۱۲±۰/۱۵*
لاکتوباسیلوس کازیی	۴/۴۳±۰/۴۷	۴/۵۸±۰/۱۷	۴/۵±۰/۲۳
لاکتوباسیلوس پاراکازیی	۴/۴۸±۰/۳۲	۴/۴۶±۰/۲۳	۴/۴۶±۰/۵۴

داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation بیان شده‌اند.
*نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه از خاصیت سایتوتوکسیتی شیمی‌درمانی برای درمان بیماران سرطانی استفاده می‌شود. اما چگونگی بوجود آمدن مقاومت دارویی در این بیماران ضروری می‌باشد (۲۷). از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر شیمی‌درمانی، مقاومت به آپوپتوزیس القاء شده توسط داروهای شیمی‌درمانی است که عمدتاً به علت بیان بالای پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوزیس رخ می‌دهد (۲۸).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

بر اساس مطالعات انجام گرفته توسط محققین، شیمی درمانی و اشعه درمانی با آسیب رساندن به DNA، از طریق p53، تومور را تحت تأثیر قرار می‌دهند. براساس نقش p53 در آپوپتوزیس پس از آسیب DNA، ژن p53 به‌عنوان یک عامل اصلی پاسخ تومور به درمان‌های سایتوتوکسیک تعیین شده است. نوع وحشی ژن p53 می‌تواند سرطان‌زایی را سرکوب نماید و به‌عنوان یک عامل رونویسی، آپوپتوزیس را افزایش دهد (۲۹). اما ژن سرکوب‌گر تومور p53 که به واسطه جهش‌های نقطه‌ای در بخش بزرگی از تومورهای انسانی غیرفعال شده است، از آپوپتوزیس جلوگیری می‌نماید و باعث پیشرفت تومور می‌شود (۳۰). مطالعات انجام شده در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی روی p53 جهش‌یافته نشان داده است که جهش در ژن p53 نه تنها منجر به کاهش عملکرد طبیعی می‌گردد، بلکه باعث بیان سطح بالای ژن جهش‌یافته p53 نیز می‌شود (۳۱). ازآنجایی‌که پروتئین p53 جهش‌یافته که درنتیجه موتاسیون ژن p53 ایجاد شده، پایدارتر از شکل طبیعی آن است؛ بنابراین به علت تجمع پروتئین p53 در سلول می‌توان آن را به‌وسیله روش ایمنوسیتوشیمی، نشان داد (۳۲). تحقیقات نشان داده که جابه‌جایی و بیان پروتئین‌های جهش‌یافته p53 در رده‌های سرطانی که فاقد p53 طبیعی می‌باشند، مقاومت در مقابل آپوپتوزیس را در مقایسه با نوع وحشی ژن p53 افزایش می دهند. حضور پروتئین جهش‌یافته p53 در تومورها، نشان می‌دهد که سلول‌ها برتری رشد انتخابی را کسب می‌نمایند (۲۹).

میلور و همکاران گزارش دادند که داروی شیمی‌درمانی Epirubicin نتوانست فاکتور رونویسی FOX (FOXM1) را در رده سلولی MCF-7EPIR سرطان پستان که فاقد p53 عملکردی می‌باشد، کاهش دهد. کاهش این فاکتور به‌عنوان عاملی برای پیشبرد چرخه سلولی، برای عملکرد داروی مذکور ضروری می‌باشد. نتایج این محققان نشان داد که وجود p53 عملکردی برای جلوگیری از مقاومت در مقابل داروی Epirubicin ضروری می‌باشد (۲۷). لذا جلوگیری از بیان p53 جهش‌یافته به‌منظور کاهش تکثیر سلولی، مقاومت شیمیایی و کاهش سرطان‌زایی در رده‌های مختلف سرطانی نشان داده شده است (۳۳).

ازآنجایی‌که القاء آپوپتوزیس روش مناسبی برای حذف سلول‌های سرطانی است و اغلب سلول‌های سرطانی دارای نقص در مکانیسم آپوپتوزی خود می‌باشند، بنابراین یافتن ترکیباتی که بتواند باعث القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی گردد، یکی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌گردد (۳۴).

در حال حاضر داروهایی که برای درمان CML به کار می‌روند، اغلب به دلیل ایجاد مقاومت دارویی و افزایش بیان مهارکنندگی آپوپتوزی، باعث جلوگیری از القاء آپوپتوزیس و درنهایت مرگ بیمار می‌شوند. از این رو مطالعات وسیعی برای یافتن داروهای جدید با توانایی القاء آپوپتوزی قوی و در عین حال کاهش دهنده بیان ژن‌های مقاوم به آپوپتوزیس در جریان است (۳۵). در این شرایط نیاز به درمان‌های اختصاصی بیشتری برای سلول‌های جهش‌یافته می‌باشد که متکی بر عملکرد p53 جهت القاء مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول نباشند (۳۶). در مورد p53 که در ۵۰٪ سرطان‌های انسانی دچار جهش می‌شود، کاربرد راهکار کشندگی سنتزی برای شناسایی ترکیباتی که به‌طور انتخابی سلول‌های سرطانی دارای p53 جهش‌یافته را حمل می‌کنند، اهمیت فوق‌العاده‌ای در کشف داروهای ضد سرطانی خواهد داشت. این داروها در صورت شناسایی و توسعه می‌توانند برای کشتن انتخابی سلول‌های سرطانی دارای p53 جهش‌یافته، استفاده شوند (۳۷). متفورمین ازجمله داروهای کشنده سنتزی می‌باشد که به‌عنوان یک داروی دیابتی احتمالاً از طریق فعال کردن AMP کیناز و مهار فسفریلاسیون اکسایش، به‌طور انتخابی موجب مهار رشد سلول‌های توموری با P53 جهش‌یافته می‌شود (۳۸).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

از جالب‌ترین و بحث‌انگیزترین ویژگی‌هایی که به باکتری های پروبیوتیک اسیدلاکتیک نسبت داده شده است، فعالیت ضد جهشی و ضد سرطانی آنها است (۳۹). برخلاف عوامل درمانی چون شیمی‌درمانی، پروبیوتیک‌ها و ترکیبات مشتق از آنها، سلول‌های توموری را بدون آسیب رساندن به سلول-های طبیعی و سایر عوارض جانبی از بین می‌برند (۴۰،۴۱). چویی و همکاران، تحقیقی پیرامون اثرات ضد سرطانی چندین گونه لاکتوباسیلوس کشته شده توسط حرارت و اجزای محلول باکتری‌ها مثل پلی‌ساکارید انجام دادند. نتایج نشانگر این بود که پروبیوتیک‌های مذکور، باعث القاء آپوپتوزیس می‌گردند (۴۲).

گروهی از محققین تأثیر سلول‌کشی و آپوپتوزی عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی بر رده سرطانی K562 لوسمی میلوییدی انسان را اثبات نمودند (۲۴،۲۵،۴۲)؛ بنابراین، سلول‌های K562 به عنوان مدل فاز حاد بیماری CML به دلیل دارا بودن ژن جهش‌یافته p53 انتخاب گردید و تأثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی بر میزان بیان پروتئین p53 رده سرطانی K562 به روش الایزا ساندویچ سنجیده شد.

محققان به مطالعه تأثیر ترکیبات مختلفی بر کاهش میزان p53 جهش‌یافته و درنتیجه پیشبرد آپوپتوزیس از مسیرهای غیر وابسته به p53 در رده‌های سرطانی متفاوتی پرداختند. مطالعات نشان داد که تعامل و فعالیت پروتئین-های p53 جهش‌یافته می‌تواند به‌واسطه اتصال پپتیدهای آپتامر (Peptid Aptamer) تنظیم شود. بر اساس مطالعات انجام شده توسط محققین، آپتامرهای جدا شده توانستند در مقایسه با تیپ وحشی ژن p53 به‌طور مؤثر با p53 های جهش‌یافته ارتباط برقرار نمایند. تعامل بین p53 جهش‌یافته و آپتامرها با استفاده از مدل‌های مولکولی مشخص شد. آپتامرها توانستند فعالیت p53 جهش‌یافته را کاهش داده و به‌طور خاصی باعث القاء آپوپتوزیس در سلول-هایی شوند که ژن p53 آنها جهش‌یافته است (۴۳).

هم‌چنین محققین اثرات JV-1-65 و JV-1-63 که آنتاگونیست‌های هورمون آزادکننده هورمون رشد و RC-3940 که آنتاگونیست پپتید آزادکننده Bombesin/Gastrin می‌باشند را روی سلول‌های توموری DMS-153 کارسینوما سلول‌های ششی انسان مورد مطالعه قرار دادند. تیمار سلول‌ها با این ترکیبات به میزان بسیار زیادی باعث القاء مهار تکثیر تومور شد. از طرفی وسترن بلات نشان داد که تأثیرات ضد توموری این آنتاگونیست‌ها وابسته به مهار بیان پروتئین جهش‌یافته p53 می‌باشد. به این ترتیب که RC-3940 به اندازه ۲۴٪ و آنتاگونیست‌های JV-1-65 و JV-1-63 نیز به ترتیب به اندازه ۱۸٪ و ۲۲٪ میزان پروتئین‌های جهش‌یافته p53 را به طور معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵ کاهش دادند (۲۹).

نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد، عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی باعث کاهش معنی‌دار سطح پروتئین حاصل از ژن جهش‌یافته p53 نسبت به گروه شاهد می‌شوند (P<۰/۰۵).

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، سلول‌های K562 در غلظت ۲۰۰۰ لاکتوباسیلوس کازیی و لاکتوباسیلوس پاراکازیی بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب، ۴۴/۵۳ و ۴۳/۲ درصد، بیشترین درصد کاهش پروتئین p53 را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. همچنین عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازیی و لاکتوباسیلوس پاراکازیی بعد از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب ۳۶/۶۲ و ۳۵/۹۲ درصد، بیشترین کاهش پروتئین جهش‌یافته p53 را داشتند. لذا مشاهده شد که دیواره سلولی نسبت به عصاره سیتوپلاسمی تأثیر بیشتری بر کاهش میزان پروتئین جهش‌یافته p53 دارد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بین کاهش میزان پروتئین p53 و القاء آپوپتوزیس در سلول‌ها با ژن p53 جهش‌یافته رابطه وجود دارد و این تحقیق مطالعات انجام

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

شده توسط کبیری (۲۴) و ریکی (۲۵) را تأیید می‌نماید. درنهایت می‌توان بیان نمود که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی صورت گرفته در این زمینه، همخوانی دارد. این می‌تواند یک استراتژی بالقوه در مهار عملکرد انکوژنیک p53 جهش‌یافته باشد و راهی برای درمان هدفمند سرطان ارائه کند. هم‌چنین در مورد استفاده از این فرآورده‌های بیولوژیک و مکانیسم تأثیر آنها بر میزان p53 در رده‌های سرطانی، انجام تحقیقات میدانی بیشتر احساس می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان «بررسی تأثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیی و پاراکازیی بر بیان ژن p53 به روش الایزا» در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ و کد ۱۲۹ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه اجرا شده است.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

References

1. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science. 1995; 267: 1445-1449.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26: 239-257.
3. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995; 267: 1456-1462.
4. Pakin DM. The Global Health Burden of Infection-Associated Cancers in the years 2002. Int J Cancer. 2006; 118(12): 3030-3044.
5. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nature Medicine. 2004; 10: 789-799.
6. Vahakangas K. TP53 mutations in workers exposed to occupational carcinogens. Hum Mutat. 2003; 21: 240-251.
7. Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?. Cancer Metas Rev. 2004; 23: 237-257.
8. Kim E, Giese A, Deppert W. Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. Biochem Pharmacol. 2009; 77: 1-20.
9. Hallstrom TC, Nevins JR. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. Cell Cycle. 2009; 8: 532-535.
10. Ingvarsson S. Molecular genetics of breast cancer progression. Semin Cancer Biol. 1999; 9: 277-288.
11. Malkin D. Germ line P53 mutations in a familial syndrome of breast cancer. Science. 1999; 250: 1233-1238.
12. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders Company. 1999; 275-300.
13. Singhal N, Bapsy P, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. JAPI. 2004; 52: 410-416.
14. Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. Bullet Trasilvania Univ Brasov. 2009; 2(51): 97-104.
15. Karpas A, Hayhoe FGJ, Green berger JS, Barker CR, Cawley JC, Lowenthal RM, et al. The establishment and cytological, cytochemical and immunological characterization of human haemic cell lines: Evidence for heterogeneity. Leuk Res. 1977; 1: 35.
16. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. Leuk Res. 1993; 17(12): 1045-1050.
17. Usuda J, Inomata M, Fukumoto H, Iwamoto Y, Suzuki T, Kuh HJ, et al. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbor 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. Int J Oncol. 2003; 22(1): 81-86.
18. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2006; 81(7): 973-988.
19. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

pharmacologic approaches. Biologicals. 2007; 1(4): 433-448.
20. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. ASH Education Program Book. 2009; (1): 453-460.
21. Tsai YT, Cheng PC, Fun CK, Pan TM. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain Lactobacillus paracasei subsp Paracasei. NTU. 2008; 101.
22. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. J Vet Sci. 2004; 5(1): 41-48.
23. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium lactis and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. Clin In Dis. 2005; 40(1): 28-37.
24. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Tehran Univ Med J. 2011; 68: 691-698. (In Persian)
25. Riki M, Farokhi F, Tukmechi A. The best time of cytotoxicity for extracted cell wall from Lactobacillus casei and paracasei in K562 cell line. Tehran Univ Med J. 2013; 11: 691-699. (In Persian)
26. Azizpour K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) of west Azarbaijan. Res J Biol Sci. 2009; 4(3): 324-326.
27. Millour J, deOlano N, Horimoto YJ, Monteiro LK, Langer J, Aligue R, et al. ATM and p53 Regulate FOXM1 Expression via E2F in Breast Cancer Epirubicin Treatment and Resistance. Mol Cancer Ther. 2011; 10(6): 1046-1058.
28. Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. Clinical Cancer Res. 2002; 8(7): 2024-2034.
29. Kanashiro C, Schally A, Groot K, Armatis P, Bernardino A, Varga J. Inhibition of mutant p53 expression and growth of DMS-153 small cell lung carcinoma by antagonists of growth hormone-releasing hormone and bombesin. Med Sciences. 2003; 100(26): 15836-15841.
30. Karimi M, Conserva F, Mahmoudi S, Bergman JG, Wiman KJN, Bykov V. Extract from Asteraceae Brachylaena ramiflora induces apoptosis preferentially in mutant p53-expressing human tumor cells. Carcinogenesis. 2010; 31(6): 1045-1053.
31. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. Cancer Cell. 2014; 25: 304-317.
32. Badinloo M, Rajabalian S, Pooraboli I, Eskandari H, Jangi-Aghdam H, Horri M. Establishment, characterization and drug sensitivity of a new Ewing's sarcoma cell

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

line (SS-ES-1). Tehran Univ Med J. 2008; 66(4): 242-250. (In Persian)
33. Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. Oncogene. 2006; 25 :304-309.
34. Jeong S, Han M, Jin C, Kim G. Apoptosis induction of human leukemia cells by Streptomyces sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. Int J Mol Med. 2010; 25(2): 31-40.
35. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly imatinib mesylateresistant bcr/abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. Mol Pharmacol. 2007; 72(3): 788-795.
36. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. Biochimica et Biophysica Acta Res Commun. 2005; 331: 834-842.
37. Fang B. Development of synthetic lethality anticancer therapeutics. J Med Chem. 2014; 57(19): 7859-7873.
38. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. Cancer Res. 2007; 67(14): 6745-6752.
39. Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. Nutrition Res Rev. 2004; (17): 277-284.
40. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. Am J Gastroenterol. 2000; 95(1): 2-4.
41. Riki M. Evaluation of the effect of Lactobacillus casei and L. paracasei isolated from common carp intestine on the expression of p53 gene in K562 cell line by ELISA. Thesis. Faculty of Science Urmia University. 2013. (In Persian)
42. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effect of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. LAM. 2006; 42: 452-458.
43. Guida E, Bisso A, Fenollar-Ferrer C, Napoli M, Anselmi CE, Girardini J, et al. Peptide Aptamers Targeting Mutant p53 Induce Apoptosis in Tumor Cells. Cancer Res. 2008; 68: 6550-6558.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]

Anticancer effect of probiotics on mutant p53 protein expression in K562 cell line

Riki M*[*1], Tukmechi A[2], Farokhi F[3]

1. MSc of Histology and Embryology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran, malihe,riki@yahoo.com.

2. Assistant Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Urmia Lack Studies Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: *21 Sep 2016* **Accepted:** *22 Jan 2017*

Abstract

Background : Probiotics are defined as different microorganisms that may have positive effects on preventing or treatment of special pathologic conditions. *Lactobacillus casei* and *L. paracasei* as probiotics could induce the apoptosis in human cancer cells in vitro. Chronic myeloid leukemia is categorized as a blood cells cancer and the most common type of leukemia. The expression of mutant p53 protein increases resistance against apoptosis in cancer lines. So the aim of this study was to evaluate the effect of *L. casei* and *L. paracasei* cell wall and cytoplasmic fractions on the expression of mutant p53 protein in K562 cancer line by ELISA.

Materials and Methods: First, *L. casei* and *L. paracasei* was cultured and disrupted by sonication and finally cell wall separated from cytoplasmic extraction by centrifugation, then prepared different concentrations of cell wall and cytoplasmic fraction. Finally, p53 protein levels were measured by ELISA, in cells treated with the cell wall and cytoplasmic fraction.

Results: ELISA result showed that cell wall and cytoplasmic fraction statistically ($P< 0.05$) reduced the levels of mutant p53 protein compared to the control.

Conclusion: It's concluded that there is a relationship between reduced expression of p53 protein and induction of apoptosis in cells with mutant p53 gene. It could provide a way for cancer treatment in a smart manner.

Keywords: K562, *L. Casei, L. Paracasei,* P53 protein.

Citation: Riki M, Tukmechi A, Farokhi F. Anticancer effect of probiotics on mutant p53 protein expression in K562 cell line. Yafte. 2017; 18(4): 87-97.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-11-13]