مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره پنج، مرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت:۱۳۹۵/۸/۱۲
تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۱۱/۳۰

بررسی اثر متابولیت های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp UW4 بر بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان

ستاره پورهواشمی[۱]، زهرا بم زاده[۲*]، لیلا روحی[۳]، نوشا ضیاء جهرمی[۴]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

مقاله پژوهشی

مقدمه: با توجه به مشکلات در حال توسعه مسمومیت سیستمیک و مقاومت دارویی در شیمی درمانی، کشف ترکیبات فعال زیستی و ضدسرطانی جدید بسیار ضروری است. بنابراین در این مطالعه به بررسی فعالیت ضدسرطانی متابولیت تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 در جهت شناسایی ترکیبات جدید پرداخته شد.

روش بررسی: مطالعه حاضر به صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۴ در دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد. ابتدا سلول‌های سرطان پستان انسان SK-BR-3 با غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با متابولیت تولید شده توسط سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 تیمارشدند و میزان بقاء سلولی با روش رنگ‌سنجی MTS مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان ژن *p53* با استفاده از روش RT-Real Time PCR بررسی شد. جهت آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS۱۶ و آزمون آماری ANOVA یک طرفه استفاده شد.

نتایج: تیمار با متابولیت تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4، نشان داد با افزایش غلظت به صورت وابسته به دوز و زمان، توان زیستی سلول‌ها کاهش پیدا کرده است، به طوری که بیشترین تأثیر مربوط به غلظت ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. هم چنین افزایش بیان ژن *p53* به ویژه در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت و در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰میلی‌گرم/میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: می‌توان از متابولیت تولید شده توسط سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 در درمان سرطان پستان SK-BR-3 استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas* sp.UW4، متابولیت، سرطان پستان SK-BR-3، توان زیستی، ژن *p53*، RT- Real Time PCR

ارجاع: پورهواشمی ستاره ، بم زاده زهرا ، روحی لیلا ، ضیاء جهرمی نوشا. **بررسی اثر متابولیت های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 بر بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۵): ۴۰۹-۳۹۹.

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳-مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۴-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد،ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۶۰۶۵۶۷۲، پست‌الکترونیکی: Bamzadehz@yahoo.com، کدپستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

مقدمه

محصولات طبیعی، ترکیبات شیمیایی و یا مواد تولید شده توسط یک موجود زنده و یا پیدا شده در طبیعت هستند که فعالیت دارویی یا بیولوژیکی دارند. موجودات زنده تولید چندین متابولیت اولیه و ثانویه می‌کنند (۱).

در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوانی برای یافتن ترکیبات جدید، به ویژه از فرآورده‌های طبیعی که خاصیت ضد سرطانی خود را از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مختلف اعمال می‌کنند، صورت گرفته است (۲). برخی از این مواد همانند تاکسول (Taxol)، اتوپوزاید (Etoposide) و سیس-پلاتین (Cisplatin)، از گیاهان به دست می‌آیند و دارای کاربردهای بالینی می باشند (۳). علاوه بر این، ترکیبات ضدسرطانی مختلفی نیز وجود دارند که توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند (۵،۴).

افزون بر این، ترکیبات ضد سرطان مختلفی نیز وجود دارند که توسط باکتری‌ها تولید می شوند. محصولات طبیعی، ترکیبات شیمیایی و یا مواد تولید شده توسط یک موجود زنده در طبیعت هستند که فعالیت دارویی یا بیولوژیکی دارند. موجودات زنده تولید چندین متابولیت اولیه و ثانویه می‌کنند. متابولیت‌های اولیه برای عملکرد ارگانیسم ضروری می‌باشند درحالی‌که، متابولیت‌های ثانویه ممکن است نقش مهمی برای خود تولیدکننده داشته و یا به‌سادگی مواد زاید باشند. با این حال متابولیت‌های ثانویه ممکن است برای انسان خواص سودمندی داشته باشند. در بسیاری از موارد می‌توان آن‌ها را به عنوان مواد خطرناک علیه بیماری‌های انسان مانند سرطان، بیماری‌های باکتریایی، التهاب و بسیاری از بیماری‌های دیگر استفاده کرد. با این وجود، به تعدادی از این متابولیت‌های ثانویه به دلیل دارا بودن فعالیت ضدمیکروبی توجه شده است. تولید مواد فعال زیستی مانند باکتریوسین‌ها که به آنتی‌بیوتیک‌ها شبیه هستند، چندین مزیت را در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. به عنوان نمونه، سمیت باکتریوسین‌ها بر روی بافت‌های حیوانی به نسبت صفر است. سنتز متابولیت‌های ثانویه و به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها دارای اهمیت اقتصادی و علمی فراوانی است. فرآیند تولید مواد ضدمیکروبی به‌طور معمول شامل غربالگری و جداسازی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، آزمایشات و تغییر بهینه‌سازی شرایط تولید می‌باشد. میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک و سایر مکان‌های طبیعی، به عنوان منبع مفیدی از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی به حساب می‌آیند. همواره، نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی به عنوان مشکلی مهم ادامه خواهد داشت زیرا هنگامی که تعداد باکتری‌های مقاوم و توزیع جغرافیایی این ارگانیسم‌ها هر دو در حال افزایش است، مقاومت ضدمیکروبی یک نگرانی در حال رشد محسوب می‌گردد. به همین دلیل، بنیادهای سلامت در جهان به دنبال برنامه‌ای جهت شناسایی ترکیبات طبیعی با فعالیت ضدمیکروبی هستند (۶).

از این رو در مطالعه حاضر از یک باکتری بومی ایران به نام *Pseudomonas* sp. UW4 که طی پژوهش های پیشین از خاک اصفهان جداسازی گردیده و به عنوان یک سویه جدید و بومی شناسایی شده است، استفاده گردید.

جنس *سودوموناس* یکی از گروه‌های بزرگ باکتری‌ها را شامل بوده و بیش از ۸۰ گونه از آن شناخته شده است (۱). سودوموناد‌ها انتشار همه جایی داشته و در خاک، آب و دریا یافت می‌شوند (۷). گرچه عمده‌ای از این گروه، بیماریزای فرصت طلب بوده اما دسته ای نیز با تولید موادی نظیر آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز از رشد عوامل بیماریزا در گیاهان جلوگیری کرده و باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. علاوه بر این تا کنون تعدادی از ترکیبات آنتی بیوتیکی که به وسیله باکتری‌های گروه *سودوموناس-فلورسنت* تولید می‌گردد از نظر ساختمان شیمیایی شناسایی شده است که اغلب ترکیباتی از گروه فنازین‌ها، پیرول‌ها و مشتقات اندول می‌باشد. تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها که حاوی ازت نیستند شناخته شده که ۲،۴- دی استیل فلورو گلوسینول از مهمترین آنها می‌باشند. این آنتی‌بیوتیک ضدباکتری،

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

ضد ویروس و ضدکرم‌های دستگاه گوارش می باشد (۸). سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن ها، رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن، می‌باشد (۹). سرطان، معمولاً با پیشرفت نا به جای چرخه سلولی و آپوپتوز ناقص، به دلیل فعال شدن پروتوانکوژن‌ها و غیر فعال شدن ژن های سرکوب کننده تومور یا TSG ایجاد می‌شود (۱۰). شیوع نوع سرطان بر اساس جنس در بین زنان و مردان متفاوت می‌باشد. به طوری که سرطان پروستات، رایج‌ترین سرطان مردان و سرطان پستان، رایج‌ترین نوع سرطان زنان در دنیا می‌باشند. سرطان پستان، در واقع نوعی کارسینومای مربوط به بافت پستان (۱۱) و یکی از مهم ترین تومورهای بدخیم در دنیا است و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در خانم ها می باشد. شیوع و میزان مرگ و میر سرطان پستان در نژادها و موقعیت‌های جغرافیایی مختلف متفاوت است و مکانیسم‌های مختلفی در شروع و پیش برد آن نقش دارند. فاکتورهای محیطی متعدد، تغییرات سوماتیک مانند موتاسیون در آنکوژن ها، ژن‌های سرکوب کننده تومور و پلی مورفیسم ژنتیکی از عوامل به وجود آورنده آن هستند (۱۲).

از زمان کشف *p53* در سال ۱۹۷۹ به عنوان انکوژن و به ویژه پس از کشف دوباره آن به عنوان ژن سرکوب کننده تومور در سال ۱۹۸۹، *p53* نامزد بسیار مهم برای درمان سرطان به شمار می‌آید (۱۰). این ژن به عنوان یک ژن تک نسخه ای روی کروموزوم ۱۷ انسان و کروموزوم ۱۱ موش قرار دارد. اندازه آن در انسان حدود ۲۰kb بوده و دارای ۱۱ اگزون می‌باشد (۱۲).

به منظور یافتن ترکیبات ضدسرطان جدید، در مطالعه حاضر، متابولیت‌های باکتری بومی ایران به نام *Pseudomonas* sp. UW4 جداسازی شد و پس از بررسی و مشاهده خاصیت آنتی‌باکتریال آن (۱۳) خاصیت ضد سرطانی این متابولیت با استفاده از رده SK-BR-3 آدنوکارسینومای پستان انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت تجربی از اردیبهشت ۱۳۹۴ تا شهریور ۱۳۹۴ در دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد.

جداسازی و شناسایی *Pseudomonas* sp. UW4

در مطالعه حاضر از سوش بومی گرم منفی *Pseudomonas* sp. UW4 جداسازی شده از خاک استفاده‌گردید. بدین منظور، ۷۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان اصفهان از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی متری کنار ریشه گیاه جمع آوری گردید و به آزمایشگاه، جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های مورد نظر انتقال داده شد. این باکتری طی پژوهش‌های قبلی از خاک استان اصفهان جداسازی شده است (۱۳).

کشت *Pseudomonas* sp. UW4 و تهیه متابولیت تولیدی آن

به منظور جداسازی متابولیت تولیدی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth)، استفاده و کشت‌ها در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس سلول‌ها از سوپرناتانت جداسازی شد و از سوپرناتانت جهت بررسی فعالیت ضدسرطانی استفاده گردید. برای این منظور مقدار ۲cc از متابولیت‌ها درون ویال‌های لیوفیلیزه ریخته و درون دستگاه لیوفیلیزاتور، به مدت ۷ ساعت فریز و سپس خشک گردید. نمونه‌های تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۱۴).

تهیه رده سلولی SK-BR-3 و کشت آن

سلول‌های رده سرطانی SK-BR-3 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد و در محیط کشت DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (گیبکو، انگلستان) در حضور ۱۰ درصد FBS; Fetal bovine serum یا سرم جنین گاوی (گیبکو، انگلستان)، ۱۰۰IU/ml پنی‌یلین/استرپتومایسین در انکوباتور با ۵٪ CO2، رطوبت ۹۸٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

سنجش خاصیت ضد توموری متابولیت تولیدی با آزمون MTS

آزمون MTS; [3- 4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl) – 2 - (4 - sulfophenyl) - 2H - tetrazolium, inner salt]، آزمونی کمی و رنگی است. احیاء MTS، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد. جهت بررسی در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای $۵×۱۰^{۳}$ سلول کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت های مختلف ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر (گروه I، II و III) جایگزین و سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط کشت نگهداری شدند (جدول ۱). از سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل استفاده شد. در هر ردیف از چاهک‌های هر پلیت در کنار غلظت‌های مختلف متابولیت یک چاهک به عنوان کنترل تیمار در نظر گرفته شد، که فاقد سلول بودند. بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر، محلول MTS به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین ± SD بیان شدند (۱۵).

بررسی تأثیر متابولیت تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 بر میزان بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3

جهت بررسی تأثیر متابولیت تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 بر میزان بیان ژن *p53* سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3) محیط کشت سلول‌های تیمار شده تخلیه و ۱ میلی‌لیتر بایوزول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس به مدت ۴ دقیقه در سانتریفیوژ دور ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه و میکروتیوب‌ها شیک و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد.

محلول رویی که محلول بی رنگ است برداشته و درون میکروتیوب ریخته شد. هم حجم فاز جدا شده ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، ایزوپروپانول تخلیه و ۱ میلی‌لیتر الکل ۷۵٪ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۷۵۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد.

به رسوب هر میکروتیوب ۴۰ میکرولیتر، آب DEPC اضافه گردید و تعیین غلظت RNA به دو صورت کیفی و کمی مورد مطالعه قرار گرفت، که روش کیفی از طریق ژل الکتروفورز و روش کمی از طریق اسپکتوفتومتری بررسی شد. بعد از تعیین میزان جذب و غلظتRNA سنتز cDNA صورت گرفت. برای سنتز cDNA، ۱ میکرولیتر Sample RNA، ۱ میکرولیتر Primer Oligo(dt)، ۱۰ میکرولیتر DEPC Water، ۴ میکرولیتر Buffer 5X، ۱ میکرولیتر Ribo Lock RNase inhibitor (20U/ML)، ۲ میکرولیتر dNTP mix، ۱ میکرولیتر RevertAid RT(200U/ML, 120 ML) در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌های استریل RNA Free استفاده شد که یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

برای بررسی بیان ژن *p53* از روش RT- Real Time PCR استفاده شد. مشخصات پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ نشان داده شده است. برای هر واکنش ۱ میکرولیتر پرایمر، ۱۰ میکرولیتر از کیت سایبرگرین QuantiFast SYBR Green PCR Kit (400) Q204054 (شرکت کیا ژن)، ۱ میکرولیتر cDNA و ۸ میکرولیتر آب فاقد RNase استفاده شد. تمامی واکنش‌های PCR جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با سه تکرار برای بیان ژن *p53* و کنترل داخلی GAPDH با روش ΔCT Relative Quantification انجام شد (۱۶،۱۷).

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS۱۶ و آزمون آماری ANOVA یک طرفه (روش مقایسه میانگین ها LSD) استفاده شد. $P< 0/05$ به عنوان شاخص آماری در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی-واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.005).

نتایج

تأثیر متابولیت *Pseudomonas* sp. UW4 بر میزان توان زیستی سلول‌های SK-BR-3

مشاهدات میکروسکوپی نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌های SK-BR-3 تیمار شده به صورت وابسته به غلظت و زمان می‌باشد (شکل ۱و۲). تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت در رده SK-BR-3 بر میزان بقا سلولی، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری شد. در تیمار ۲۴ ساعته، در همه گروه‌ها توان زیستی رده SK-BR-3 به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که گروه II و III نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بودند. در تیمار ۴۸ ساعته، در همه گروه‌ها میزان بقا، به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که این اختلاف نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (نمودار ۱). همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بودند ($P<0.05$).

بررسی تأثیر متابولیت تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 بر میزان بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3

توسط تکنیک RT-Real Time PCR، میزان تغییرات بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3 در غلظت‌های ۵،۱۰ و ۲۰ از روش ΔΔCT Relative Quantification به دست آمد. از ژن مرجع GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

در منحنی‌های Amplification plot، خط افقی چرخه و خط عمودی شدت فلورسانس را نشان می‌دهد، که هر چه نمودارها به سمت چپ حرکت کنند بیان ژن *p53* بیشتر می‌شود. تفسیر منحنی‌ها در ادامه ذکر گردیده است.

انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌ها با تیمار نشان داد که میزان بیان ژن به صورت وابسته به دوز می‌باشد، به گونه ای که با افزایش غلظت، میزان بیان ژن *p53* نیز نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد، که این افزایش بیان در گروه II و III نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($p<0.05$). در انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با تیمار نیز میزان بیان ژن به صورت وابسته به دوز بود، به گونه‌ای که با افزایش غلظت، میزان بیان ژن *p53* نیز نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، که این افزایش بیان در هر ۳ گروه نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (شکل ۳ و ۴، نمودار ۲) ($p<0.05$).

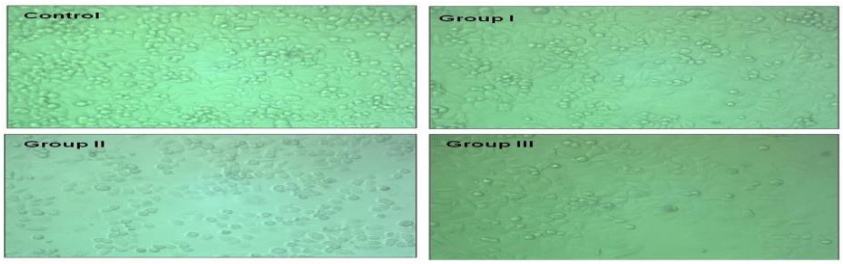
جدول ۱: گروه‌بندی رده سلولیSK-BR-3 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف متابولیت ضدمیکروبی *Pseudomonas* sp. UW4

گروه بندی	غلظت متابولیت ضد میکروبی *Pseudomonas* sp. UW4 (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)
گروه I	رده سلولی درمعرض غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر
گروهII	رده سلولی درمعرض غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر
گروه III	رده سلولی درمعرض غلظت ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر

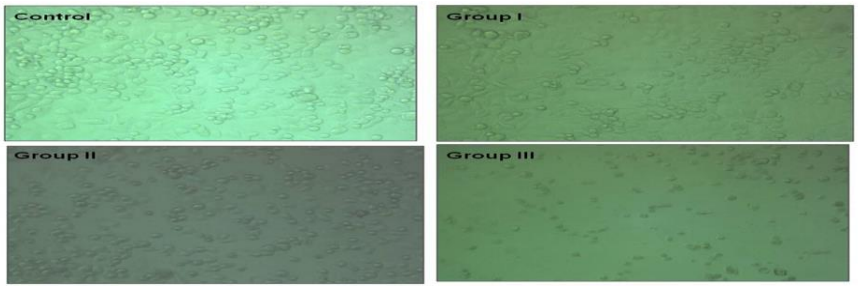
جدول۲: پرایمر ژن های *p53* و *GAPDH*

Official Name (gene)	Primer	Size (bp)
p53	F	ACATAGTGTGGTGGTGCCCT
	R	ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC
GAPDH	F	CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG
	R	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG

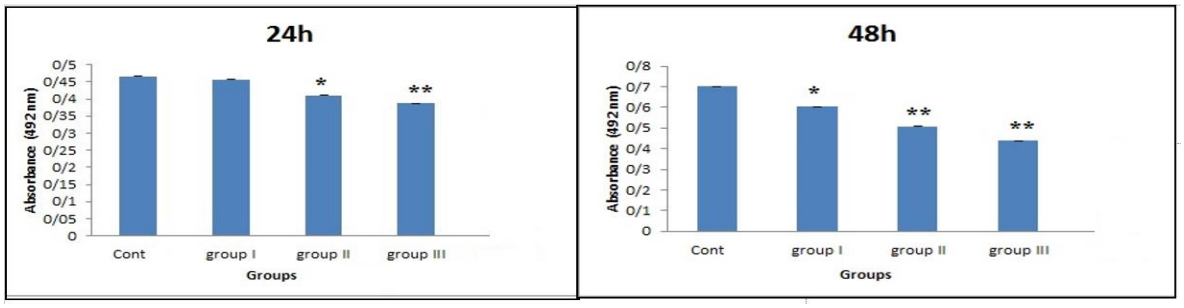
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019



شکل ۱: تأثیر غلظت های مختلف متابولیت *Pseudomonas* sp. UW4 بر رده سلول های SK-BR-3 در مدت زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون

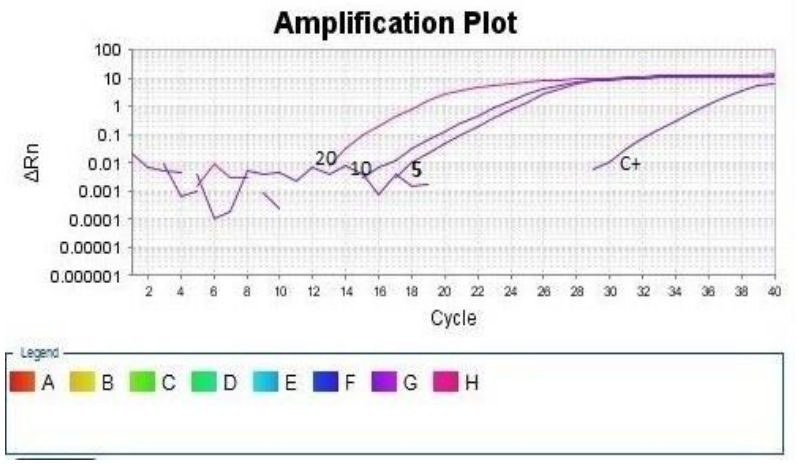


شکل ۲: تأثیر غلظت های مختلف متابولیت *Pseudomonas* sp. UW4 بر رده سلول های SK-BR-3 در مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون



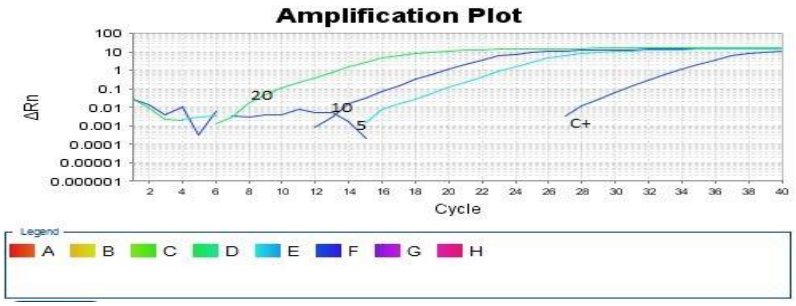
نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف متابولیت بر توان زیستی رده سلول های SK-BR-3 در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون،

(* = P<0.05 ، ** = P<0.001 ، اختلاف معنی دار با گروه کنترل)

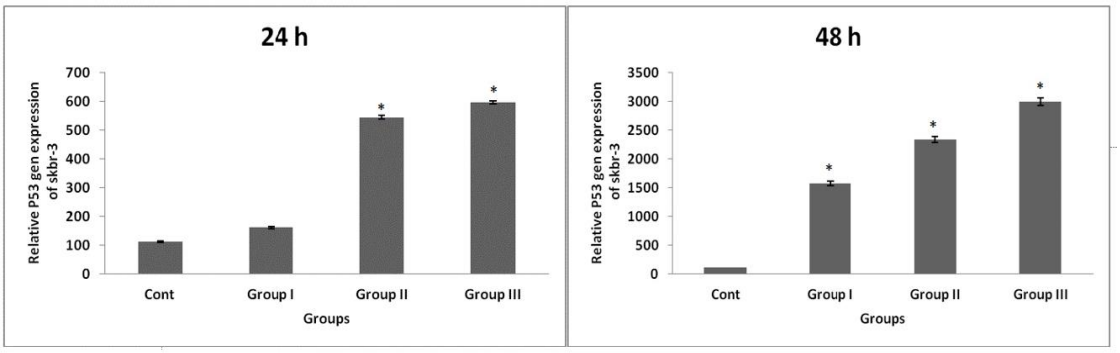


شکل ۳: منحنی Amplification Plot مربوط به ژن *p53* در سلول های SK-BR-3 در گروه های I، II **و** III در مدت زمان ۲۴ ساعت

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019



شکل ۴: منحنی Amplification Plot مربوط به ژن *p53* در سلول های SK-BR-3 در گروه های I، II و III در مدت زمان ۴۸ ساعت



نمودار ۲: میزان بیان ژن *p53* در گروه های آزمایشی در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون (*= P<0.05، اختلاف معنی دار با گروه کنترل)

بحث

متابولیت‌های ضدمیکروبی طبیعی، متابولیت‌هایی هستند که می‌توان آنها را در گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها یافت. امروزه متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید شده توسط باکتری‌ها را می‌توان به عنوان یک منبع درمانی جدید برای از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و درمان سرطان در نظر گرفت (۱۸،۱۹). سرطان کلمه‌ای است که برای بسیاری از بیماری‌های مختلف که علل وجودی گوناگون دارند و از راه‌های مختلف درمان می‌شوند به کاربرده می‌شود. سرطان یک مسئله با اهمیت در طب امروزی است (۲۰). اگر دسته‌ای از سلول‌ها به علت عدم توانایی در حذف خودشان دچار تکثیر بی رویه شوند، سرطان ایجاد می شود (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Thanomsub و همکاران درسال ۲۰۰۷ در تایلند بر روی ساختار شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی رامنولیپیدهای تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa B189* جدا شده از زباله‌های کارخانه شیر انجام شد، مشاهده شد رامنولیپیدهای تولیدی دارای اثر ضدبقاء بر روی رده سلول سرطانی پستان انسان (Mcf-7) با حداقل غلظت مهاری ۶/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بودند (۲۲). نتایج این مطالعه، تائیدی بر تحقیق حاضر است که نشان داد متابولیت های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 با حداقل غلظت مهاری ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر روی رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان اثر ضدبقاء داشتند.

در مطالعه Phonnok و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تایلند، بررسی القا متابولیت‌های میکروبی بر فعالیت‌های ضدسرطانی و فعالیت آپوپتوز صورت گرفت و مرگ سلولی ناشی از عصاره میکروبی به عنوان نامزد انتخابی عامل ضدسرطان مطرح گردید (۲۳). در تحقیق حاضر با توجه به این که تغییر در بیان ژن *p53* که نقش در آپوپتوز سلولی دارد، بررسی شده است مشاهده گردید که متابولیت‌های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 با حداقل غلظت مهاری ۵ میلی گرم/میلی‌لیتر بر روی رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان اثر ضدبقاء داشته، به این صورت که افزایش بیان ژن *p53* نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز سلولی بود.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

تحقیقات Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در تایوان که اثر باکتری‌های لاکتیک اسید بر بقاء سلول سرطانی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند، نشان داد که گونه‌های *لاکتوباسیلوس* بومی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی قوی بر روی رده سلولی MDA-MB-231 دارند (۲۴). در تحقیق حاضر تأثیر متابولیت‌های تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 بر روی رده سلولی سرطان پستان SK-BR3 بررسی شد که نتایج نشان داد که این متابولیت‌ها از طریق افزایش بیان ژن *p53* نقش در ایجاد آپوپتوز و در کل خاصیت ضدسرطانی دارند.

P.lane و همکاران در سال ۲۰۱۲ در سنگاپور، مطالعه‌ای بر درمان سرطان مبتنی بر *p53* انجام دادند. نتایج این تحقیق نشان داد، با تغییر در پردازش*p53* در سلول‌های توموری خمیده، می‌توان تغییراتی در سلول‌های T و B نسبت به *p53* در جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی ایجاد کرد (۲۵) که تائیدی بر نتایج تحقیق حاضر است. به این صورت که در تحقیق حاضر نیز، تاثیر متابولیت‌های تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 بر میزان بیان ژن *p53* در رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان نشان داد که متابولیت‌های تولیدی این سوش بومی نیز می‌تواند باعث افزایش بیان این ژن شده و در از بین بردن سلول‌های سرطانی SK-BR-3 ایفا نقش کند.

در بررسی که توسط Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۳ در چین بر روی ساختار شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی بیوسورفاکتانت تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa M14808* انجام شد، مشخص شد که نوع دی رامنولیپید فعالیت ضدتکثیری در برابر سلول‌های سرطانی پستان انسان در حداقل غلظت یک میکروگرم را داشت (۲۶). در صورتی که در تحقیق حاضر حداقل غلظت مهاری که مورد بررسی قرار گرفت و اثر مهاری بر روی رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان نشان داد، ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود که با این حال فعالیت ضد تکثیری متابولیت‌های تولیدی *Pseudomonas* sp. UW4 را تائید می کند.

مطالعات Vazquez-Rivera در سال ۲۰۱۵ در مکزیک، تأثیر سمیت سلولی چرخه دی‌پپتید ها از *Pseudomonas aeruginosa PAO1* را در آپوپتوز رده‌های سلولی سرطانی انسان مورد بررسی قرار داد. مشاهده شد این ترکیبات می‌توانند ۵۰٪ اثر مهاری داشته باشند (۲۷) درتحقیق حاضر نیز متابولیت‌های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 در غلظت های مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بر روی رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان اثر ضدبقاء داشتند، به این صورت که با افزایش بیان ژن *p53* افزایش آپوپتوز سلولی مشاهده شد.

نتیجه گیری

به طور کلی، با توجه به نقایص به وجود آمده در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و نیز وجود مقاومت داروئی در این سلول‌ها، شناسایی ترکیبات جدید مهارکننده رشد سلولی همانند متابولیت‌های سویه بومی *Pseudomonas* sp. UW4 می‌تواند برای مطالعات بیشتر در زمینه درمان سرطان کمک کننده باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان " تاثیر متابولیت های سویه بومی *Pseudomonas* sp.UW4 بر میزان بیان ژن *p53* در رده سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3)" مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد. ضمناً هزینه های مالی این تحقیق به عهده محققین بوده است.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سید حسین حجازی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی که در انجام این تحقیق حمایت‌های لازم را مبذول فرمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

References:

1-Hayek SA, Gyawali R, Ibrahim SA. (2013). ***Antimicrobial natural products.*** *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed); 2013: 910-21.*

2-Hyewon S, Oh H, Lee C. ***Benzyldihydroxyoctenone, a novel nonsteroidal antiandrogen, shows differential apoptotic induction in prostate cancer cells in response to their androgen responsiveness.*** *J Microbiol Biotechnol 2011; 21(5): 540-4.*

3-Taraphdar A, Roy M, Bhattacharya R. ***Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention***. *Curr Sci 2001; 80(11):1387-96.*

4-Lin X, Wen Y, Li M, Chen Z. ***A new strain of Streptomyces avermitilis produces high yield of oligomycin A with potent anti- tumor activity on human cancer cell lines in vitro.*** *Appl Microbiol Biotechnol 2009; 8: 839-45.*

5-Lee JW, Shin J, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY. ***Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum***. *J Vet Sci 2004; 5(1): 41-8.*

6-Pasiar M, Rouhi L, Bamzadeh Z, Hejazi SH. ***In vitro selective growth inhibition of breast adenocarcinoma cell lines by Pseudomonas sp.UW4 metablites.*** *TUMS 2018; 74(9): 614-20. (Persian)*

7-Malekzadeh F, Shahamat M. ***General Microbiology***. *5th ed. Tehran: Tehran University Publishing Company; 2009: 409-10. (Persian)*

8-Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Talebi Jahromi KH. ***Study on Production of Some Antimicrobial Metabolites by Flourescent Pseudomonads***. *Iranian J Agric Sci 2004; 35(3): 731-39. (Persian)*

9-Amiri Nodijeh A, Samiee SH, Davari M. ***Molecular Biology of Cancer.*** *1th ed. Tehran: Biology Home Publishing Company; 2012: 10-16. (Persian)*

10- Noori-daloii MR, Abdollahzade R. ***Role of p53 in apoptosis and cancer therapy. Q*** *Horizon Med Sci 2014; 20(3): 191-201. (Persian)*

11- Sheikhpour R, Taghipour Zahir S. ***Evaluation of Tp53 codon 72 polymorphism and resulted protein in breast cancer patients in Yazd city.*** *IBGD 2014; 7(3): 20-9. (Persian)*

12- khani H, Hosseinpourefeizi M, Pouladi N, Chaparzadeh N, Montazeri V, Azarfam P. ***Detection of p53 gene exons 5 and 6 mutations among east azerbaijani women with breast cancer.*** *ZUMS 2012; 20 (78):36-46. (Persian)*

13- Skandari SH. ***Isolation and identification of antimicrobial metabolites producers gram- negative bacteria from Isfahan soil*** *[Dissertation]. Islamic Azad University, Shahrekord Branch., 2015.*

14- Bamzadeh Z, Baserisalehi M, Bahador N, Hejazi SH. ***Screening of soil Streptomyces and characterization of their bioactive componds.*** *HealthMED 2013; 7(8): 2293-300.*

15- Shi J, Lu X, Wang B, Daudan L, Yanan W, Yuhui B, Zhenfeng M. ***Roles of Y box-binding protein 1 in SK-BR-3 breast cancer proliferation.*** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2014; 30; 94(36): 2804-7.*

16- Kargar M, Ghorbani-Dalini S Doosti A, Souod N. ***Real-Time PCR assay using allele-specific TaqMan***

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

probe for dDetection of clarithromycin resistance and its point mutations in Helicobacter pylori. *IUMS 2011; 29 (126): 65-73. (Persian)*

17- *Azadmanesh K, Roohvand F, Amini S, Andalibi Mahmoodabadi S, Kazanji M.* ***Isolation of IFN-gamma gene from olive baboon and designed semi-quantitative competitive PCR method to quantify gene expression.*** *Horizon Med Sci 2004; 10 (3): 20-30. (Persian)*

18- *Muhammad SA, Ahmad S, Hameed A.* ***Report: antibiotic production by thermophilic Bacillus SAT-4.*** *Pak J Pharm Sci 2009; 22(3): 339-45.*

19- *Zabeti SM, Ismaili A, Madah-Arefi H, Nazarian-Firouzabadi F, Mojiri.* ***Separation of secondary metabolites in DNA extraction process of Thymus and analysis of them by GC mass.*** *IJBIO 2014; 1(27): 66-74. (Persian)*

20- *Saffari Z, Aryapour H, Foroumadi A, Akbarzadeh A.* ***In vitro evaluation of 4H-chromene 3-carbonitrile derivatives' biological effects on T47D human breast cancer cell line***. *NCMBJ 2014; 4 (14) : 51-8.*

21- *Armstrong K, Eisen A, Weber B.* ***Assessing the risk of breast cancer.*** *N Engl J Med 2000; 342 (8):564-71.*

22- *Thanomsub B, Pumeechockchai W, Limtrakul A, Arunrattiyakorn P, Petchleelaha W, Nitoda T, Kanzaki H.* ***Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa B189 isolated from milk factory waste.*** *Bioresour Technol 2007; 98(5): 1149-53.*

23- *Phonnok S, Tenechpong tamb W, Wangsatayanon B.* ***Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites.*** *J of Biotech 2010; 13(5): 1-12.*

24- *Liu C, Pan T.* ***In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity.*** *J Food Drug Anal 2010; 18(2): 77-86.*

25- *Lane DP, Fang Chok C, Lain S.* ***p53 based cancer therapy.*** *CSH 2010; 2: 1-24.*

26- *Zhao J, WuY Alfred A, Xin X, Yang Sh.* ***Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by Pseudomonas aeruginosa M14808.*** *JCPR 2013; 5(12): 177-82.*

27- *Vazquez-Rivera D, Gonzalez O, Guzman-Rodríguez JL, Diaz-Perez A, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Bucio J, et al.* ***Cytotoxicity of cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 Leads to apoptosis in human cancer cell lines***. *BioMed Research International 2014; 2015: 1-28- 9.*

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26| NO 5 | Aug 2018

Received: 2 Nov 2016
Accepted: 18 Feb 2017

Survey the effect of produced metabolites by native *Pseudomonas* sp. UW4 on *p53* gene expression in SK-BR-3 breast cancer cell line

Setareh Pourhavashemi[1], Zahra Bamzadeh[*2], Leila Rouhi[3], Noosha Zia-Jahromi[4]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 5:06 IRST on Thursday March 21st 2019

Original Article

Introdution: Regarding to the development the problems of systemic toxicity and drug resistance in cancer chemotherapy, the continuing discovery of new bioactive compounds and anticancer agents is very necessary. Therefore, in this study, we checked the anticancer activity of native *Pseudomonas* sp. UW4 metabolite to find new compound.

Methods: This experimental study was performed in Shahrekord Islamic Azad University from April 2015 to August 2015. First SK-BR-3 human breast cancer cells with different concentrations (5, 10 and 20 mg/ml) were treated with produced metabolite by native *Pseudomonas* sp. UW4 for 24 and 48 hours. Cell viability was assessed by MTS assay. Then, *p53* expression was detected by RT-Real Time PCR. For statistical analysis, SPSS16 software and one way ANOVA test were used.

Results: Treatment with produced metabolite by the native *Pseudomonas* sp. UW4 showed the decreases the viability of cells in a time and dose dependent manner, the most effective concentration of this substance was 20 mg/ml and 48 h after treatment. Also, an increase in *p53* gene expression, significantly in 10 and 20 mg/ml after 24 h and 5, 10 and 20 mg/ml after 48h was observed ($P<0.05$).

Conclusion: Produced metabolite by native *Pseudomonas* sp. UW4 could be used for treatment of SK-BR-3 breast cancer.

Keywords: *Pseudomonas* sp.UW4, Metabolite, Breast cancer SK-BR-3, Cell viability, *p53* gene, RT-Real Time PCR

Citation: Pourhavashemi S, Bamzadeh Z, Rouhi L, Zia-Jahromi N. **Survey the effect of produced metabolites by native *Pseudomonas* sp. UW4 on *p53* gene expression in SK-BR-3 breast cancer cell line.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(5): 399-409.

[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.
[2]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran.
[3]Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[4]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.
***Corresponding author: Tel:**09136065672, **email:** Bamzadehz@yahoo.com