

تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) به وسیله انترتوکسین B استافیلوکوکی

سارا افضلی^۱، عباس دوستی^{۲*}، منصور حیدری^۳، ناهید بابایی^۴، پروانه کشاورز^۵

مقاله پژوهشی

مقدمه: سرطان سینه یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان می‌باشد. مبتلایان به این عارضه در نتیجه استفاده از راهکارهای درمانی دارای پاسخ به درمان ضعیفی هستند و عود مجدد در میان آن‌ها به فراوانی دیده می‌شود. در این مطالعه اثر انترتوکسین B استافیلوکوکی بر بیان ژن‌های *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت. انترتوکسین B استافیلوکوکی عضو توانمندی از خانواده سموم/استافیلوکوکوس/اورئوس می‌باشد که به عنوان یک عامل ضد سرطان با توانایی انهدام سلول‌های سرطانی شناخته می‌شود.

روش بررسی: این مطالعه به صورت تجربی در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. سلول‌های رده MCF-7 با استفاده از معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰، به وسیله پلاسمیدهای pcDNA3.1(+)-*seb* (نوترکیب) و pcDNA3.1(+) (غیرنوترکیب) ترانسفورم شدند و با کشت در محیط انتخابی RPMI-1640 محتوی 600 µg/mL آنتی‌بیوتیک G418 انتخاب گردیدند. سپس میزان بیان ژن‌های *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول‌های ترانسفکت شده از طریق آنالیز Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری با استفاده از آزمون تی-استیودنت از طریق نرم‌افزار SPSS Inc., Chicago, IL; Version 16 و هم‌چنین برنامه Excel مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که، انترتوکسین B استافیلوکوکی به‌طور قابل‌توجهی بیان ژن‌های آپوپتوزی را در سلول‌های رده MCF-7 تغییر می‌دهد. در حالیکه افزایش بیان معنی‌داری برای ژن‌های *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، مشاهده گردید، بیان ژن‌های *BCL-2* و *Survivin* به‌طور معنی‌داری کاهش را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. ($P=0.032$)

نتیجه‌گیری: انترتوکسین B استافیلوکوکی دارای اثر مهاری بر رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌های آدنوکارسینومای پستان از طریق تغییر بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد زمینه تحقیقاتی مناسبی برای بهره‌برداری از این سم در کنترل و درمان آدنوکارسینومای پستان انسان وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، انترتوکسین B، آپوپتوز، *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *BCL-2*، *Survivin*، MCF-7

ارجاع: افضلی سارا، دوستی عباس، حیدری منصور، بابایی ناهید، کشاورز پروانه. تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *BCL-2* و *Survivin* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) به وسیله انترتوکسین B استافیلوکوکی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۶): ۸۵-۱۶۷۷.

۱- دانشجوی دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی- مولکولی، گروه سلولی- مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استاد تمام، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه سلولی- مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران

۵- دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰، پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com، صندوق پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

مقدمه

در بین انواع مختلف سرطان، سرطان پستان به عنوان شایع ترین و کشنده ترین بدخیمی در بین زنان، یکی از مهم ترین عوامل نگران کننده سلامت آن ها در جهان می باشد. سرطان پستان بیماری است که در آن سلول های بدخیم منشاء گرفته از بافت سینه بدون آن که موجب عکس العمل تدافعی و تهاجمی سیستم ایمنی بدن شوند، از آن عبور کرده و به طور نامنظم و فزاینده ای تکثیر می یابند. این بدخیمی در اکثر موارد به صورت یک توده بدون درد و سفت در قسمت فوقانی و خارجی سینه شروع می شود و به طور کلی می تواند در هر جایی از بافت سینه ظاهر گردد. به علاوه سرطان سینه ممکن است به غدد لنفاوی، ناحیه گودی زیر بغل و بعد از آن به سرتاسر بدن گسترش پیدا نماید (۱،۲). اگرچه میزان شیوع سرطان پستان در همه کشورها در حال افزایش است ولی در ایالات متحده و اروپا، شیوع آن دو برابر کشورهای آسیایی است. بروز سرطان پستان در ایران در مطالعات مختلف از ۱۱/۹ در صد هزار در استان اردبیل تا ۲۳/۵ در صد هزار در استان آذربایجان شرقی ذکر شده است. در گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی سال ۱۳۸۷ همچنان سرطان پستان در زنان در رتبه اول قرار داشته و با میزان بروز استاندارد شده سنی (Rate Standardized Aged) ۳۳/۲ بالاتر از موارد گزارش شده سرطان پوست می باشد (۳). وضعیت جغرافیایی، نحوه زندگی، رژیم غذایی، عوامل استرس زا، سن، جنس و ژنتیک از جمله عوامل مستعدکننده ابتلا به سرطان پستان و تاخیر در تشخیص و درمان، از جمله عوامل پیش برنده بیماری، کاهش میزان بقای مبتلایان و افزایش مرگ و میر ناشی از سرطان سینه به شمار می روند (۲،۴). جراحی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و پرتودرمانی از جمله گزینه های درمانی موجود برای سرطان پستان می باشند که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرند (۵،۶). اما با توجه به انتشار بیماری به اندام های دیگر، عمل جراحی یک روش بسیار مؤثر درمانی در نظر گرفته نمی شود. همچنین به دنبال استفاده از شیمی درمانی، پرتودرمانی و

داروهای ضدسرطان نیز عود، متاستاز، سمیت و همچنین پاسخ های بالینی مشاهده می شود. بنابراین لازم است که روش های درمانی مؤثر و جایگزین شناسایی شوند (۷،۸). باکتری ها از کاندیدهای بالقوه در این زمینه می باشند. باکتری ها به دلیل دارا بودن ویژگی های منحصر به فردی از جمله؛ هدف گیری اختصاصی تومور، نفوذ فعال در بافت توموری و ایجاد سمیت کنترل شده در میان سایر روش های درمانی سرطان دارای جایگاه ویژه ای می باشند (۹). طیف استفاده از باکتری ها در درمان سرطان وسیع می باشد که بهره گیری از سموم آن ها از گزینه های مؤثر به حساب می آید. سموم می توانند در تکثیر، تمایز و مرگ برنامه ریزی شده سلولی تداخل نمایند (۱۰). یکی از این باکتری ها که نقش بالقوه ضد سرطانی سموم تولیدی آن تایید شده است، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. این باکتری گرم مثبت تولیدکننده سمومی نظیر انتروتوکسین B (SEB) می باشد که قادرند در سلول های سرطانی مسیر سیگنالی مرگ برنامه ریزی شده سلولی را هدف گیری نمایند و رشد و تکثیر آن ها را تحت تاثیر قرار دهند (۱۱).

بررسی توانایی پروآپوپتوزی SEB که از سموم برهم کنش کننده با غشاء سلولی می باشد در طیف وسیعی از سلول ها از جمله؛ لنفوسیت ها، مونوسیت ها و سلول های اپیتلیال نشان داد که این سم عمدتاً آپوپتوز را از طریق مسیر داخلی و در حضور فاکتورهای Fas، IL-4، TNF- α و Bcl-2 القاء می نماید. به طور مثال SEB به ترتیب با تکیه بر Fas و چرخه تنظیم مثبت TNF- α باعث تحریک القاء آپوپتوز در Jurkat و Tcell و سلول های THP-1 از طریق مسیر خارجی می شود (۱۲،۱۳). به علاوه SEB آپوپتوز را در سلول های اپیتلیال کلیوی و سلول های ECV304 از مسیر خارجی و TNF- α القاء می نماید (۱۱). لذا به نظر می رسد بتوان از سم انتروتوکسین B به تنهایی یا با مصرف هم زمان آن با داروهای شیمی درمانی جهت بهبود سریع تر سرطان استفاده نمود. هدف از این مطالعه ارزیابی نقش پروآپوپتوزی انتروتوکسین B استافیلوکوکی در

Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Mettler, Germany) با فشار پنج درصد گاز CO₂، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته‌ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. پس از کشت هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۸۵ درصد رسید، به منظور ترانسفورماسیون، تعداد 5×10^6 سلول MCF-7، درون سه چاهک از پلیت شش چاهکی کشت داده شد. سپس با استفاده از معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA)، سلول‌ها در چاهک‌های اول و دوم به ترتیب توسط، pcDNA3.1(+)-*seb* (به عنوان پلاسمید نوترکیب) و pcDNA3.1(+)-*seb* (به عنوان پلاسمید کنترل)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده ترانسفورم شدند (افزودن ۴ μg پلاسمید به محیط کشت DMEM فاقد سرم در هر چاهک، به نسبت یک به سه). پس از ترانسفورماسیون، ظرف مدت ۱۰ روز سلول‌ها در معرض محیط تازه حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر G418 و ۱۰ درصد FBS قرار گرفتند. برای ارزیابی عملکرد دقیق G418، چاهک سوم محتوی سلول‌های MCF-7 غیر ترانسفورم بود.

استخراج RNA، سنتز cDNA و بررسی میزان بیان ژن

با استفاده از معرف RNA، RNX-Plus (SinaClon, Iran)، RNA تام سلولی طبق دستورالعمل شرکت سازنده از هر دو نوع سلول MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب و غیرنوترکیب به صورت جداگانه، استخراج گردید. غلظت و خلوص RNAهای استخراج شده توسط نانو دراپ (Nanodrop ND-1000 Technologies, Wilmington, DE, USA) با طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانش شد. به‌منظور انجام مرحله Heat block، نمونه‌های حاصل از مرحله قبل در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه تمام توالی‌های RNA با استفاده از کیت سنتز (RevertAID First Standard cDNA Syn Kit) (Termo Scientific, Lithuania)، به cDNA تبدیل و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. واکنش RT-PCR به‌منظور تعیین بیان ژن *seb* در سلول‌های MCF-7 ترانسفورم

سلول‌های سرطانی پستان و تعیین اهمیت آن برای بهره برداری به‌عنوان یک استراتژی جدید در زمینه درمان سرطان می‌باشد.

روش بررسی

نوع مطالعه

این مطالعه به صورت تجربی از بهمن ۹۷ تا تیر ۹۸ با هدف ارزیابی نقش پروآپوپتوزی انتروتوکسین B استافیلوکوکی به عنوان عامل مداخله‌گر و بدون اعمال شیوه کورسازی در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد.

آماده‌سازی حامل نوترکیب

توالی cDNA ژن رمز کننده انتروتوکسین B استافیلوکوکی (*seb*) از بانک اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) استخراج گردید و به‌دنبال آن بهینه‌سازی کدون‌ها انجام شد. سپس توالی *seb* توسط شرکت Generay Biotech Co., Ltd. (Shanghai, China) سنتز و با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر BamHI / EcoRV در وکتور pcDNA3.1(+)-*seb* ساب کلون گردید. وکتورهای pcDNA3.1(+)-*seb* (نوترکیب) و pcDNA3.1(+)-*seb* (غیرنوترکیب) با استفاده از روش ترانسفورماسیون شوک حرارتی در حضور کلرید کلسیم به درون سلول‌های E. coli سویه TOP10F انتقال یافتند و سلول‌ها در محیط Luria-Bertani (LB) حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کشت و غربالگری شدند. سپس جهت تایید صحت کلونینگ استخراج پلاسمید از سویه مذکور صورت گرفت. به منظور دستیابی به پلاسمید خالص و عاری از آلودگی‌هایی نظیر پروتئین یا RNA از کیت تجاری مخصوص تخلیص پلاسمید (Qiagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد.

کشت و ترانسفورماسیون سلول‌های رده MCF-7

رده سلولی (MCF-7) (Michigan Cancer Foundation-7) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. سلول‌های MCF-7 در محیط کشت RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد

شده، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر محتوی سه میکرولیتر cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۷۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۵/۵ میکرولیتر DNA پلیمرز Taq، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۱۵/۷۵ میکرولیتر ddH₂O آماده گردید و درون دستگاه ترموسایکلر طی ۳۰ سیکل طبق برنامه Initial Denaturation به مدت پنج دقیقه در دما ۹۴ درجه سانتی گراد، Denaturation به مدت یک دقیقه در دما ۹۴ درجه سانتی گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دما ۵۶ درجه سانتی گراد و Final Extention به مدت پنج دقیقه در دما ۷۲ درجه سانتی گراد تکثیر یافت. در نهایت جهت بررسی محصول PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. سنجش میزان بیان ژن های *FAS*، *BAK*، *Survivin*، *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX* با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل (Rotor gene 6000 corbett, Australia) مورد ارزیابی قرار گرفت. مخلوط واکنش برای هر نمونه حاوی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) اختصاصی (جدول ۱)، کنترل NTC، ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی و رنگ سایبرگرین (Takara, Japan)، به عنوان گزارشگر آماده گردید (جدول ۲). سپس مخلوط واکنش آماده شده بر روی یخ با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طی مراحل مختلف واکنش تحت

تأثیر برنامه دمایی زمانی به شرح زیر قرار گرفتند: مرحله Initial denaturation: مدت زمان چهار دقیقه، دما ۹۵°C، یک سیکل. مرحله Denaturation: مدت زمان ۱۵ ثانیه، دما ۹۵°C، ۴۰ سیکل. مرحله Annealing: مدت زمان ۲۰ ثانیه برای هر هفت ژن، دمای ۶۴°C برای ژن های *FAS* و *GAPDH* و دمای ۶۵°C برای ژن های *Seb*، *BCL-2*، *BAX* و *TNF-a* و دمای ۶۶°C برای ژن *BAK*، ۴۰ سیکل. پس از پایان واکنش به منظور تایید اختصاصی بودن محصول واکنش و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی نظیر آغازگر دایمر آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت و اندازه آن ها با الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد تعیین گردید. هم چنین به منظور دستیابی به میزان تغییرات در بیان ژن های موردنظر از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification) استفاده شد (۱۴).

تحلیل و تجزیه آماری

بررسی آماری با استفاده از آزمون تی- استیودنت از طریق نرم افزار SPSS Inc., Chicago, IL; Version 16 انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $p < ۰/۰۵$ معنی دار محسوب گردید.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر تایید شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

ژن ها	نام آغازگر	توالی آغازگر 5' - 3'	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)	طول محصول (جفت باز)
<i>Seb</i>	پیشرو پسرو	5'-AGGACACAAAGGTGGGCAACTAC-3' 5'- TACGCTTGTCTGTCTGGTGGGAG-3'	۶۵	۱۷۱
<i>BCL-2</i>	پیشرو پسرو	5'- GACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3' 5'- CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCCAC-3'	۶۵	۲۴۵
<i>BAX</i>	پیشرو پسرو	5'- AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC-3' 5'- GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG-3'	۶۵	۲۳۴
<i>FAS</i>	پیشرو پسرو	5'- CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC-3' 5'-GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC-3'	۶۴	۱۶۳
<i>BAK</i>	پیشرو پسرو	5'-CGTTTTTTACCGCCATCAGCAG-3' 5'- ATAGCGTCGGTTGATGTCGTCC-3'	۶۶	۱۵۴
<i>TNF-a</i>	پیشرو پسرو	5'- GCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTG-3' 5'- TTTGCTACAACATGGGCTACAGG-3'	۶۵	۱۸۴
<i>GAPDH</i>	پیشرو پسرو	5'- GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3' 5'- GGTACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	۶۴	۱۸۳
<i>Survivin</i>	پیشرو پسرو	5'- AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG-3' 5'- CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'	۶۴	۱۷۰

جدول ۲: مقادیر واکنش‌گرهای RT-Real Time PCR

ترکیبات	حجم	غلظت نهایی
cDNA	۲ میکرولیتر	کمتر از ۱۰۰ نانوگرم/واکنش
Forward پرایمر	۰/۱۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول
Reverse پرایمر	۰/۱۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول
RNase-free water	۶/۲ میکرولیتر	-
SYBR	۱۰ میکرولیتر	X۲
کلرید منیزیم	۱/۵ میکرولیتر	-
حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر	-

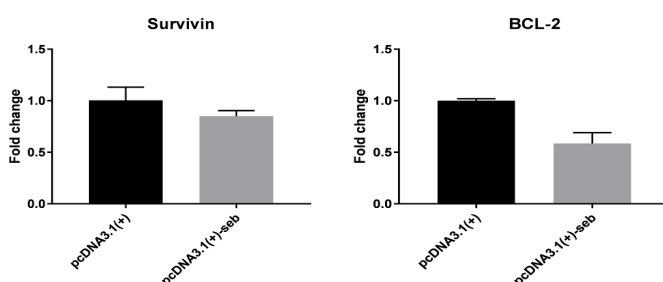
نتایج

بیان ژن *seb* در سلول‌های رده MCF-7

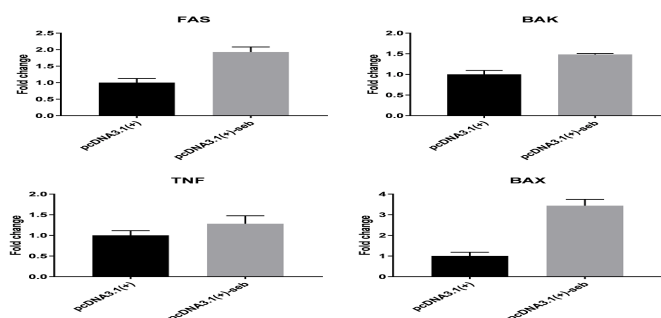
به‌منظور تعیین بیان ژن رمزکننده انتروتوکسین B استافیلوکوکی در سلول‌های رده MCF-7، هر دو نوع سلول ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب و غیرنوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج واکنش RT-PCR، حضور قطعه‌ای به طول ۱۷۱ جفت باز مربوط به cDNA ژن *seb* را در سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب تایید نمود.

تغییر بیان ژن‌های پروآپوپتوزی در سلول‌های MCF-7 به وسیله انتروتوکسین B استافیلوکوکی

میزان بیان ژن‌های *BAK*، *FAS*، *BAX*، *TNF-α*، *Survivin* و *BCL-2* نیز در هر دو نوع سلول MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب و غیرنوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل مقادیر Ct حاصل از دستگاه Real Time PCR با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بیانگر کاهش قابل توجه در بیان ژن‌های *BCL-2* و *Survivin* ($P < 0.5$) و افزایش قابل توجه در بیان ژن‌های *BAK*، *FAS*، *BAX* و *TNF-α* ($P < 0.05$) در سلول‌های MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب در مقایسه با سلول‌های کنترل بود (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱: نمودار میزان بیان ژن‌های *BCL-2* و *Survivin* بر اساس Ct بیان ژن‌های *BCL-2* و *Survivin* در سلول‌های MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب مقابل سلول‌های کنترل به طور قابل توجهی کاهش یافته است. $P < 0.5$ ؛ اختلاف معنی‌دار در مقابل گروه کنترل.



نمودار ۲: نمودار میزان بیان ژن های *BAK*, *FAS*, *BAX* و *TNF-α* بر اساس Ct. بیان ژن های *BAK*, *FAS*, *TNF-α* در سلول های MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نو ترکیب مقابل سلول های کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافته است. $P < 0.5$ ؛ اختلاف معنی دار در مقابل گروه کنترل.

نتایج نشان داد که انتروتوکسین B و آلفاتوکسین هر دو از طریق مکانیسم مشابهی یعنی از طریق مسیر خارجی و با دخالت $TNF-α$ و کسپاز ۸ آپوپتوز را در رده سلولی ECV304 القاء می نمایند (۱۱). در سال ۲۰۱۴، با استفاده از دو نوع ماده القاء کننده پاسخ ایمنی یعنی اگزوزوم و انتروتوکسین B استافیلوکوکی ساختار جدیدی سنتز نمودند و اثر مهاری آن بر رشد سلول های سرطانی سینه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ساختار اگزوزوم انتروتوکسین B سنتز شده آپوپتوز را در سلول های سرطانی سینه القاء می نماید و می تواند به عنوان یک کاندید درمانی در نظر گرفته شود (۲۱). به طور مشابه، در سال ۲۰۱۵، ساختار جدیدی براساس تگزوزوم (نانوزیکول های اندوزومی) و انتروتوکسین B استافیلوکوکی طراحی شد و اثر سمیت سلولی آن بر رده سلول های سرطانی تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ساختار تگزوزوم- انتروتوکسین B دارای خواص سمیت سلولی بر روی سلول های مورد بررسی می باشد (۲۲). در سال ۲۰۱۶، خاصیت آپوپتوزی انتروتوکسین B استافیلوکوکی را در سلول های THP-1 مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که انتروتوکسین B قادر است از طریق فعال سازی کسپازها آپوپتوز را در سلول های THP-1 القاء نماید (۱۳). در مطالعه حاضر نیز توانایی انتروتوکسین استافیلوکوکی نوع B در مهار رشد و القاء آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 از طریق اعمال تغییر در بیان ژن های رمز کننده پروتئین های دخیل در مسیر مرگ سلولی مورد

بحث

نقش باکتری ها به عنوان عوامل ضد سرطان تقریباً صد سال پیش کشف شد. Busch و Fehleisen دو پزشک آلمانی به طور جداگانه مشاهده کردند که انواع خاصی از سرطان ها در نتیجه ابتلای بیمار به عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس پایوژنز که به صورت اتفاقی در زمان بستری در بیمارستان، رخ می دهند، بروز می کنند. سپس مشاهدات ویلیام کالی، پزشک آمریکایی در روند بهبودی یکی از بیمارانش که از سرطان گردن رنج می برد پس از ابتلا به عفونت سرخرکی، باعث شد تا او برای اولین بار ایده استفاده از باکتری ها و سموم آن ها را در درمان سرطان مطرح نماید (۱۵). مطالعات کنونی نیز نشان می دهند که سموم باکتریایی می توانند تمایز، تکثیر و مرگ برنامه ریزی شده سلولی را کنترل نمایند (۱۶). به عنوان مثال بررسی ها در سال های ۲۰۰۳ و ۲۰۱۰ نشان داد که سالمونلا و کلستریدیا از عوامل بالقوه ضد سرطان می باشند (۱۷، ۱۸). در سال ۲۰۱۲، درمان ملانوم متاستاتیک با سالمونلا تیفی موریوم اگزوتروفیک، عدم عود مجدد را نشان داد (۱۹). به علاوه مشخص شده است که استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان پاتوژن بزرگ انسان دارای سموم مختلفی نظیر خانواده انتروتوکسین ها می باشد که آپوپتوز را القاء می نمایند. لذا این ویژگی باعث شده است تا این پاتوژن قدیمی به یک عامل درمانی جدید برای سلامت انسان تبدیل شود (۲۰). در سال ۲۰۱۳، اثر انتروتوکسین B و آلفا توکسین استافیلوکوکی بر رده سلولی ECV304 مورد بررسی قرار گرفت.

این راستا، بعد جدیدی را در زمینه درمان سرطان ایجاد نموده است.

سیاس‌گذاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر در قالب بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی تحت عنوان (تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) به وسیله انتروتوکسین B استافیلوکوکی) در سال ۱۳۹۸ می‌باشد، که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر و همچنین کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد اعلام می‌داریم.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل شده نشان داد که، بیان ژن رمزکننده انتروتوکسین B استافیلوکوکی در رده سلولی MCF-7 صورت می‌گیرد و محصول آن متعاقباً بیان ژن‌های درگیر در روند آپوپتوز را در سلول‌های رده MCF-7 تغییر می‌دهد.

نتیجه‌گیری

امروزه مقاومت به درمان‌های مرسوم ضد سرطان در بیماران مبتلا به تومورهای جامد احساس نیاز به درمان‌های جایگزین را ایجاد کرده است. سوپرآنتی‌ژن‌های باکتریایی، از جمله انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، عوامل جدید و مفیدی برای هدف‌گیری سلول‌های توموری و افزایش ایمنی ضد تومور می‌باشند. موفقیت این راهکار درمانی از عملکرد اختصاصی آن بر علیه سلول‌های سرطانی همراه با داشتن کم‌ترین سمیت برای سلول‌های طبیعی ناشی می‌شود. تحقیقات بیشتر و پیشرفت در

References:

- 1-Akbari A, Razzaghi Z, Homaee F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari ME. *Parity and Breastfeeding are Preventive Measures against Breast Cancer in Iranian Women*. Breast cancer 2011; 18(1): 51-5.
- 2-Onsory K, Ranapoor S. *Breast Cancer and the Effect of Environmental Factors Involved*. NCMBJ 2011; 1(4): 59-70.
- 3-Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, et al. *The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival*. Clin breast cancer 2005; 6(5): 391-401.
- 4-Tahergorabi Z, Moodi M, Mesbahzadeh B. *Breast Cancer: A Preventable Disease*. J Birjand Unvi Med Sci 2014; 21(2): 126-141.
- 5-Powell S. *Radiotherapy for Breast Cancer in the 21st Century*. Breast J 2010; 16 Suppl 1: S34-8.
- 6-Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. *Cancer Stem Cells*. Int J Biochem Cell Biol 2012; 44(12): 2144-51.
- 7-Ikeda H, Taira N, Nogami T, Shien K, Okada M, Shien T, et al. *Combination Treatment with Fulvestrant and Various Cytotoxic Agents (Doxorubicin, Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbine, And 5-Fluorouracil) Has a Synergistic Effect in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer*. Cancer Sci 2011; 102(11): 2038-42.
- 8-Ryan RM, Green J, Lewis CE. *Use of Bacteria in Anti-Cancer Therapies*. Bioessays 2006; 28(1): 84-94.
- 9- St Jean AT, Zhang M, Forbes NS. *Bacterial Therapies: Completing the Cancer Treatment Toolbox*. Curr Opin Biotechnol 2008; 19(5): 511-7.

- 10- Sabzehali F, Azimi H, Goudarzi M. *Bacteria as a Vehicle in Cancer Therapy and Drug Delivery*. J Paramedical Sciences 2017; 8(1): 52-9.
- 11- Yu FL, Liu TT, Zhu X, Yang WX, Zhang T, Lin N, et al. *Staphylococcal Enterotoxin B and A-Toxin Induce the Apoptosis of ECV304 Cells via Similar Mechanisms*. Mol Med Rep 2013; 8(2): 591-6.
- 12- Xu SX, McCormick JK. *Staphylococcal Superantigens in Colonization and Disease*. Front Cell Infect Microbiol 2012; 2: 52.
- 13- Zhang X, Shang W, Yuan J, Hu Z, Peng H, Zhu J, et al. *Positive Feedback Cycle of Tnfa Promotes Staphylococcal Enterotoxin B-Induced THP-1 Cell Apoptosis*. Front Cell Infect Microbiol 2016; 6: 109.
- 14- Pahle J, Menzel L, Niesler N, Kobelt D, Aumann J, Rivera M, et al. *Rapid Eradication of Colon Carcinoma by Clostridium Perfringens Enterotoxin Suicidal Gene Therapy*. BMC Cancer 2017; 17(1): 129.
- 15- Oelschlaeger, TA. *Bacteria as Tumor Therapeutics?*. Bioeng Bugs 2010; 1(2): 146-7.
- 16- Forbes, NS. *Engineering the Perfect (Bacterial) Cancer Therapy*. Nat Rev Cancer 2010; 10(11): 785-94.
17. Leschner S, Weiss S. *Salmonella—Allies in the Fight Against Cancer*. J Mol Med (Berl) 2010; 88(8): 763-73.
18. Minton NP. *Clostridia in Cancer Therapy*. Nat Rev Microbiol 2003; 1(3): 237-42.
19. Zhao M, Suetsugu A, Ma H, Zhang L, Liu F, Zhang Y, et al. *Efficacy Against Lung Metastasis With a Tumor-Targeting Mutant of Salmonella Typhimurium in Immunocompetent Mice*. Cell Cycle 2012; 11(1): 187-93.
20. Aziz M, Jacob A, Wang P. *Revisiting Caspases in Sepsis*. Cell Death Dis 2014; 5(11): e1526.
21. Mahmoodzadeh Hosseini H, Imani Fooladi AA, Soleimanirad J, Nourani MR, Davaran S, Mahdavi M. *Staphylococcal Enterotoxin B Anchored Exosome Induces Apoptosis in Negative Estrogen Receptor Breast Cancer Cells*. Tumor Biol 2014; 35(4): 3699-707.
22. Mahmoodzadeh Hosseini H, Soleimanirad J, Mehdizadeh Aghdam E, Amin M, Imani Fooladi AA. *Texosome-Anchored Superantigen Triggers Apoptosis in Original Ovarian Cancer Cells*. Med Oncol 2015; 32(1): 409.

Change in the Expression of *BAK* *FAS* *BAX* *TNF-α* *BCL-2* and *Survivin* Apoptosis Genes of the Human Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) by Staphylococcal Enterotoxin B

Sara Afzali¹, Abbas Doosti^{*2}, Mansour Heidari³, Nahid Babaei⁴, Parvaneh Keshavarz⁵

Original Article

Introduction: Breast cancer is one of the most prevalent malignancies among women. Patients whose suffering from this condition, as a result of the use of conventional therapies often have a poor response to treatment and the relapse among them is frequent. In this study, the effects of staphylococcal enterotoxin type B on *BAK*, *FAS*, *BAX*, *TNF-α*, *BCL-2* and *Survivin* genes expression in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) was examined. Staphylococcal enterotoxin B is a powerful member of the *Staphylococcus aureus* toxins family, which is known as an anticancer agent with potential for killing cancer cells.

Methods: The experimental study was carried out at the Biotechnology Research Center of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. By using Lipofectamine 2000 reagent, MCF-7 cells transfected with the pcDNA3.1(+)-seb (recombinant) and pcDNA3.1(+) (non-recombinant) plasmids and were selected by culturing in a selective medium of RPMI- 1640 containing 600 µg / mL antibiotic G418. Then, the expression of *BAK*, *FAS*, *BAX*, *TNF-α*, *BCL-2*, and *Survivin* genes in transfected cells were analyzed by real time PCR. Student's t-test, SPSS Inc., Chicago, IL; Version 16 and also Excel program for statistical analysis were used.

Results: The results of this study indicated that staphylococcal enterotoxin type B (SEB) remarkably changes the expression of apoptotic related genes in MCF-7 cell line. It was observed a significant increase in the expression of *BAK*, *FAS*, *BAX*, and *TNF-α* genes, the expression of *BCL-2* and *Survivin* genes significantly decreased compared to the control group ($P=0/032$).

Conclusion: Staphylococcal enterotoxin type B has an inhibitory effect on the growth, proliferation and invasion of breast adenocarcinoma cells through altering the expression of the genes involved in the apoptosis process. Therefore, it seems that there is a good research field for the use of this toxin in the control and treatment of human breast adenocarcinoma.

Keywords: *Breast cancer, Enterotoxin B, Apoptosis, MCF-7, BAK, FAS, BAX, TNF-α, BCL-2, Survivin.*

Citation: Afzali S, Doosti A, Heidari M, Babaei N, Keshavarz P. Change in the Expression of *BAK*, *FAS*, *BAX*, *TNF-α*, *BCL-2* and *Survivin* Apoptosis Genes of the Human Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) by Staphylococcal Enterotoxin B. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(6): 1677-85.

¹Department of Molecular Cell Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran.

²Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

³Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Molecular Cell Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran.

⁵Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

*Corresponding author: Tel: 09133838830, email: abbasdoosti@yahoo.com