

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

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 سلول های سرطان پستان انسان SK-BR-3 با غلظت های مختلف (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت با متابولیت تولید شده توسط سویه بومی *Pseudomonas sp. UW4* تیمار شدند و میزان بقاء سلولی با روش رنگ سنجی 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 سلول ها کاهش پیدا کرده است، به طوری که بیشترین تأثیر مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر و در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول ها بود. هم چنین افزایش بیان ژن *p53* به ویژه در غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت و در غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر بعد از ۴۸ ساعت مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: می توان از متابولیت تولید شده توسط سویه بومی *Pseudomonas sp. UW4* در درمان سرطان پستان SK-BR-3 استفاده کرد.

واژه های 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، پست الکترونیکی: Bamzadehz@yahoo.com، کد پستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵

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 می کنند (۱).

در سال های اخیر تلاش های فراوانی برای یافتن ترکیبات جدید، به ویژه از فرآورده های طبیعی که خاصیت ضد سرطانی خود را از طریق القای آپوپتوز در سلول های سرطانی مختلف اعمال می کنند، صورت گرفته است (۲). برخی از این مواد همانند تاکسول (Taxol)، اتوپوزاید (Etoposide) و سیس-پلاتین (Cisplatin)، از گیاهان به دست می آیند و دارای کاربردهای بالینی می باشند (۳). علاوه بر این، ترکیبات ضدسرطانی مختلفی نیز وجود دارند که توسط باکتری ها تولید می شوند (۴، ۵).

افزون بر این، ترکیبات ضد سرطان مختلفی نیز وجود دارند که توسط باکتری ها 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 می کنند. متابولیت های اولیه برای عملکرد ارگانیسم ضروری می باشند در حالی که، متابولیت های ثانویه ممکن است نقش مهمی برای خود تولیدکننده داشته و یا به سادگی مواد زاید باشند. با این حال متابولیت های ثانویه ممکن است برای انسان خواص سودمندی داشته باشند. در بسیاری از موارد می توان آن ها را به عنوان مواد خطرناک علیه بیماری های انسان مانند سرطان، بیماری های باکتریایی، التهاب و بسیاری از بیماری های دیگر استفاده کرد. با این وجود، به تعدادی از این متابولیت های ثانویه به دلیل دارا بودن فعالیت ضد میکروبی توجه شده است. تولید مواد فعال زیستی مانند باکتریوسین ها که به آنتی بیوتیک ها شبیه هستند، چندین مزیت را در مقایسه با آنتی بیوتیک ها دارند. به عنوان نمونه، سمیت باکتریوسین ها بر روی بافت های حیوانی به نسبت صفر است. سنتز متابولیت های ثانویه و به ویژه

آنتی بیوتیک ها توسط میکروارگانیسم ها دارای اهمیت اقتصادی و علمی فراوانی است. فرآیند تولید مواد ضد میکروبی به طور معمول شامل غربالگری و جداسازی تعداد وسیعی از میکروارگانیسم ها، آزمایشات و تغییر بهینه سازی شرایط تولید می باشد. میکروارگانیسم های جدا شده از خاک و سایر مکان های طبیعی، به عنوان منبع مفیدی از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی به حساب می آیند. همواره، نیاز به آنتی بیوتیک ها و ترکیبات ضد میکروبی به عنوان مشکلی مهم ادامه خواهد داشت زیرا هنگامی که تعداد باکتری های مقاوم و توزیع جغرافیایی این ارگانیسم ها هر دو در حال افزایش است، مقاومت ضد میکروبی یک نگرانی در حال رشد محسوب می گردد. به همین دلیل، بنیادهای سلامت در جهان به دنبال برنامه ای جهت شناسایی ترکیبات طبیعی با فعالیت ضد میکروبی 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 *Sودوموناس* یکی از گروه های بزرگ باکتری ها 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 می شوند (۷). گرچه عمده ای از این گروه، بیماریزای فرصت طلب بوده اما دسته ای نیز با تولید موادی نظیر آنتی بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز از رشد عوامل بیماریزا در گیاهان جلوگیری کرده و باعث افزایش رشد گیاه می شوند. علاوه بر این تا کنون تعدادی از ترکیبات آنتی بیوتیکی که به وسیله باکتری های گروه *سودوموناس-فلورسنت* تولید می گردد از نظر ساختمان شیمیایی شناسایی شده است که اغلب ترکیباتی از گروه فنازین ها، پیرول ها و مشتقات اندول می باشد. تعدادی از آنتی بیوتیک ها که حاوی ازت نیستند شناخته شده که ۲،۴-دی استیل فلورو گلو سینول از مهمترین آنها می باشند. این آنتی بیوتیک ضد باکتری،

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* استفاده گردید. 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 سانتی‌فیوژ 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)، ۱۰۰ IU/ml پنی‌لین/استرپتومایسین در انکوباتور با ۵٪ CO₂، رطوبت ۹۸٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

ضد ویروس و ضدکرم‌های دستگاه گوارش می‌باشد (۸). سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه آن‌ها، 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 پروتئین‌ها و غیر فعال شدن ژن‌های 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 مهم‌ترین تومورهای بدخیم در دنیا است و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در خانم‌ها می‌باشد. 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 آنکوژن‌ها، 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 آنکوژن 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 ۲۰ kb 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.

سنجش خاصیت ضد توموری متابولیت تولیدی با آزمون

MTS

آزمون MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) - 2 - (4-sulfophenyl) - 2H - tetrazolium, inner salt). آزمون کمی و رنگی است. احیاء MTS، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول های زنده رخ می دهد. جهت بررسی در هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای 5×10^3 سلول کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت های مختلف ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر (گروه I، II و III) جایگزین و سلول ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط کشت نگهداری شدند (جدول ۱). از سلول های بدون تیمار به عنوان کنترل استفاده شد. در هر ردیف از چاهک های هر پلیت در کنار غلظت های مختلف متابولیت یک چاهک به عنوان کنترل تیمار در نظر گرفته شد، که فاقد سلول بودند. بعد از گذشت زمان های 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 الیزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده ها به صورت میانگین \pm 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* سلول های آدنوکارسینومای پستان انسان (SK-BR-3) محیط کشت سلول های تیمار شده تخلیه و ۱ میلی لیتر بایوزول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس به مدت ۴ دقیقه در سانتریفیوژ دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. به هر میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه و میکروتیوب ها شیک و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس

به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰، دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ 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 فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، ایزوپروپانول تخلیه و ۱ میلی لیتر الکل ۷۵٪ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۷۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 غلظت RNA 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، ۱ میکرولیتر inhibitor (20U/ML)، ۲ میکرولیتر dNTP mix، ۱ میکرولیتر RevertAid RT(200U/ML, 120 ML) در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب های استریل RNA Free استفاده شد که یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد 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 واکنش های PCR جهت تجزیه و تحلیل داده ها با سه تکرار برای بیان ژن *p53* و کنترل داخلی GAPDH با روش $\Delta\Delta$ CT Relative Quantification انجام شد (۱۶، ۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS ۱۶ 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 ۱ و ۲). تأثیر 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 *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 $\Delta\Delta CT$ 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.

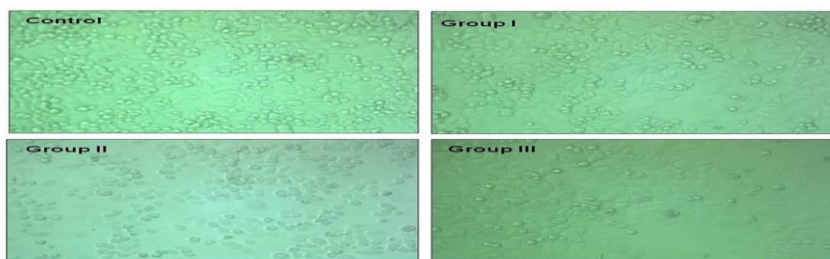
انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌ها با تیمار نشان داد که میزان بیان ژن به صورت وابسته به دوز می‌باشد، به گونه‌ای که با افزایش غلظت، میزان بیان ژن *p53* نیز نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد، که این افزایش بیان در گروه II و III نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.05$). در انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با تیمار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

جدول ۱: گروه‌بندی رده سلولی SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف متابولیت ضد میکروبی *Pseudomonas sp. UW4*

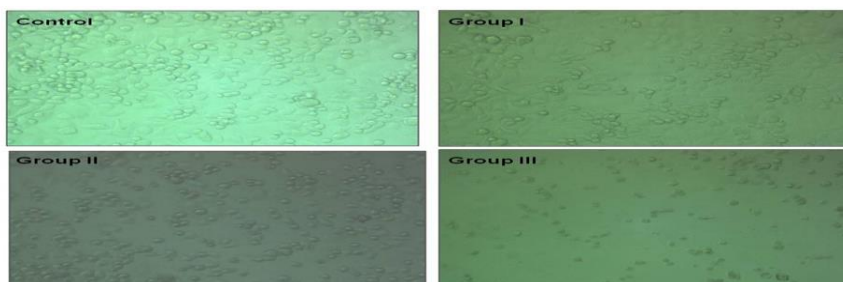
| گروه بندی | غلظت متابولیت ضد میکروبی <i>Pseudomonas sp. UW4</i> (میلی گرم/ میلی لیتر) |
|-----------|---|
| گروه I | رده سلولی در معرض غلظت ۵ میلی گرم/ میلی لیتر |
| گروه II | رده سلولی در معرض غلظت ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر |
| گروه III | رده سلولی در معرض غلظت ۲۰ میلی گرم/ میلی لیتر |

جدول ۲: پرایمر ژن های *p53* و *GAPDH*

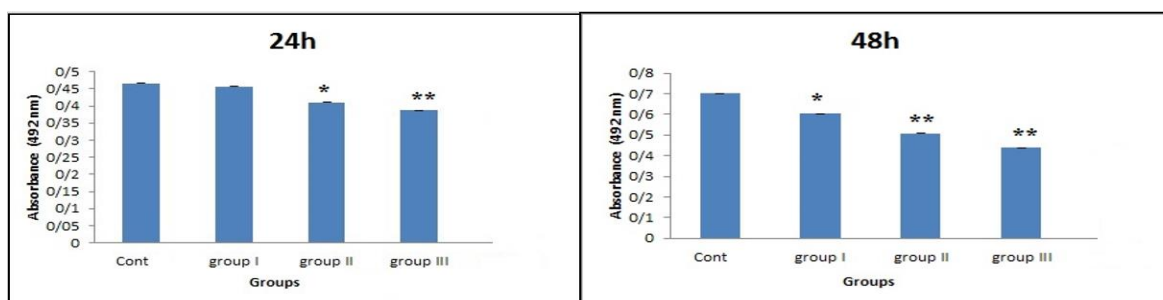
| Official Name (gene) | Primer | Size (bp) |
|----------------------|--------|------------------------|
| <i>p53</i> | F | ACATAGTGTGGTGGTGCCT |
| | R | ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC |
| <i>GAPDH</i> | F | CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG |
| | R | AGGGGAGATTCAAGTGTGGTG |



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

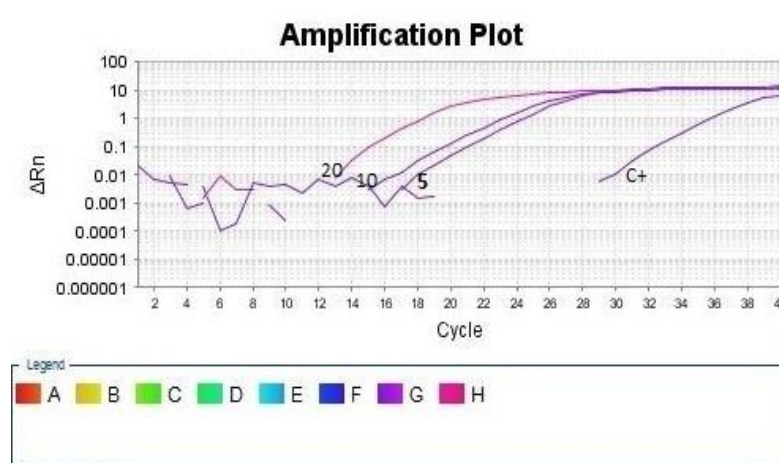


شکل ۲: تأثیر غلظت های مختلف متابولیت *Pseudomonas sp. UW4* بر رده سلول های SK-BR-3 در مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون

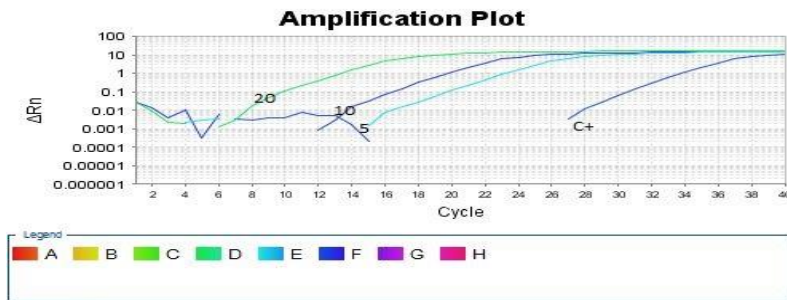


نمودار ۱: تأثیر غلظت های مختلف متابولیت بر توان زیستی رده سلول های SK-BR-3 در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون،

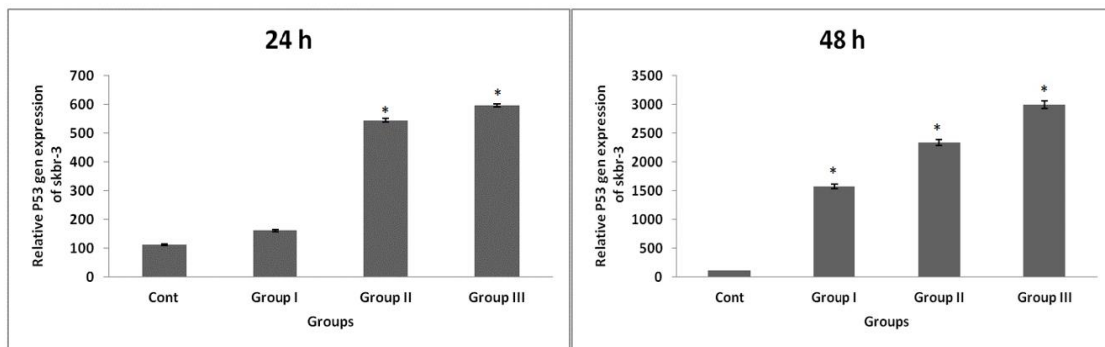
($P < 0.05 = *$ ، $P < 0.001 = **$ ، اختلاف معنی دار با گروه کنترل)



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



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)

روی رده سلول سرطانی پستان انسان (Mcf-7) با حداقل غلظت مهاری ۶/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر 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 میلی گرم/میلی لیتر 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 متابولیت های میکروبی بر فعالیت های 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 متابولیت های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas sp. UW4* با حداقل غلظت مهاری ۵ میلی گرم/میلی لیتر بر روی رده سلولی SK-BR-3 سرطان پستان انسان اثر ضدبقاء داشته، به این صورت که افزایش بیان ژن *p53* نشان دهنده افزایش آپوپتوز سلولی بود.

بحث

متابولیت های ضد میکروبی طبیعی، متابولیت هایی هستند که می توان آنها را در گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها یافت. امروزه متابولیت های ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری ها را می توان به عنوان یک منبع درمانی جدید برای از بین بردن باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و درمان سرطان در نظر گرفت (۱۸،۱۹). سرطان کلمه ای است که برای بسیاری از بیماری های مختلف که علل وجودی گوناگون دارند و از راه های مختلف درمان می شوند به کار برده می شود. سرطان یک مسئله با اهمیت در طب امروزی است (۲۰). اگر دسته ای از سلول ها به علت عدم توانایی در حذف خودشان دچار تکثیر بی رویه شوند، سرطان ایجاد می شود (۲۱).

در مطالعه ای که توسط Thanomsab و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تایلند بر روی ساختار شیمیایی و فعالیت های بیولوژیکی رامنولپیدهای تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa B189* جدا شده از زباله های کارخانه شیر انجام شد، مشاهده شد رامنولپیدهای تولیدی دارای اثر ضدبقاء بر

مطالعات Vazquez-Rivera در سال ۲۰۱۵ در مکزیک، تأثیر سمیت سلولی چرخه دی‌پپتیدها از *Pseudomonas aeruginosa* PAOI را در آپوپتوز رده‌های سلولی سرطانی انسان مورد بررسی قرار داد. مشاهده شد این ترکیبات می‌توانند ۵۰٪ اثر مهاری داشته باشند (۲۷) در تحقیق حاضر نیز متابولیت‌های تولیدی سویه بومی *Pseudomonas sp. UW4* در غلظت‌های 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 دارویی 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 "تأثیر متابولیت‌های 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 هزینه‌های 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.

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 تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است. به این صورت که در تحقیق حاضر نیز، تأثیر 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 بیوسورفکتانت 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 تأیید می‌کند.

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. **Benzylidihydroxyoctenone, 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 metabolites**. *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-dalooi 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**

- 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: 1-9.*

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

Setareh Pourhavashemi¹, Zahra Bamzadeh^{*2}, Leila Rouhi³, Noosha Zia-Jahromi⁴

Original Article

Introduction: 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.

¹Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran.

³Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

⁴Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Sahrekord, Iran.

*Corresponding author: Tel:09136065672, email: Bamzadehz@yahoo.com