

تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی *Survivin* و *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) به وسیله انتروتوکسین 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 انتروتوکسین B استافیلوکوکی بر بیان ژن‌های *Survivin* و *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت. انتروتوکسین 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(+)-*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 *Survivin*، *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* 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، انتروتوکسین B استافیلوکوکی به‌طور قابل توجهی بیان ژن‌های آپوپتوزی را در سلول‌های رده MCF-7 تغییر می‌دهد. در حالیکه افزایش بیان معنی‌داری برای ژن‌های *Survivin*، *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* مشاهده گردید، بیان ژن‌های *Survivin*، *BCL-2* به‌طور معنی‌داری کاهش را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. ($P=0.032$)

نتیجه‌گیری: انتروتوکسین B استافیلوکوکی دارای اثر مهار 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 بهره برداری از این سم در کنترل و درمان آدنوکارسینومای پستان انسان وجود داشته باشد.

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

ارجاع: افضلی سارا، دوستی عباس، حیدری منصور، بابایی ناهید، کشاورز پروانه. تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی *Survivin*، *BCL-2*، *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان انسان (MCF-7) به وسیله انتروتوکسین 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 به‌عنوان شایع‌ترین و کشنده‌ترین بدخیمی در بین زنان، یکی از مهم‌ترین عوامل نگران‌کننده سلامت آن‌ها در جهان می‌باشد. سرطان پستان بیماری است که در آن سلول‌های بدخیم منشاء گرفته از بافت سینه بدون آن‌که موجب عکس‌العمل تدافعی و تهاجمی سیستم ایمنی بدن شوند، از آن عبور کرده و به طور نامنظم و فزاینده‌ای تکثیر می‌یابند. این بدخیمی در اکثر موارد به‌صورت یک توده بدون درد و سفت در قسمت فوقانی و خارجی سینه شروع می‌شود و به طور کلی می‌تواند در هر جایی از بافت سینه ظاهر گردد. به‌علاوه 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 می‌باشد (۳). وضعیت جغرافیایی، نحوه زندگی، رژیم غذایی، عوامل استرس‌زا، سن، جنس و ژنتیک از جمله عوامل مستعدکننده ابتلا به سرطان پستان و تاخیر در تشخیص و درمان، از جمله عوامل پیش‌برنده بیماری، کاهش میزان بقای مبتلایان و افزایش مرگ و میر ناشی از سرطان سینه به شمار می‌روند (۲،۴). جراحی، شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی و پرتودرمانی از جمله گزینه‌های درمانی موجود برای سرطان پستان می‌باشند که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵،۶). اما با توجه به انتشار بیماری به اندام‌های دیگر، عمل جراحی یک روش بسیار مؤثر درمانی در نظر گرفته نمی‌شود. هم‌چنین به دنبال استفاده از شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و

داروهای ضدسرطان نیز عود، متاستاز، سمیت و هم‌چنین پاسخ‌های بالینی مشاهده می‌شود. بنابراین لازم است که روش‌های درمانی مؤثر و جایگزین شناسایی شوند (۷،۸). باکتری‌ها از کاندیدهای بالقوه در این زمینه می‌باشند. باکتری‌ها به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله؛ هدف‌گیری اختصاصی تومور، نفوذ فعال در بافت توموری و ایجاد سمیت کنترل شده در میان سایر روش‌های درمانی سرطان دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشند (۹). طیف استفاده از باکتری‌ها در درمان سرطان وسیع می‌باشد که بهره‌گیری از سموم آن‌ها از گزینه‌های مؤثر به حساب می‌آید. سموم می‌توانند در تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی تداخل نمایند (۱۰). یکی از این باکتری‌ها که نقش بالقوه ضد سرطانی سموم تولیدی آن تایید شده است، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. این باکتری گرم مثبت تولیدکننده سمومی نظیر انتروتوکسین B (SEB) می‌باشد که قادرند در سلول‌های سرطانی مسیر سیگنالی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را هدف‌گیری نمایند و رشد و تکثیر آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (۱۱).

بررسی توانایی پروآپوپتوزی SEB که از سموم برهم‌کنش‌کننده با غشاء سلولی می‌باشد در طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله؛ لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و سلول‌های 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 می‌نماید. 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 سلول‌های THP-1 از طریق مسیر خارجی می‌شود (۱۲،۱۳). به‌علاوه SEB آپوپتوز را در سلول‌های اپیتلیال کلیوی و سلول‌های ECV304 از مسیر خارجی و TNF- α القاء می‌نماید (۱۱). لذا به نظر می‌رسد بتوان از سم انتروتوکسین B به تنهایی یا با مصرف هم‌زمان آن با داروهای شیمی‌درمانی جهت بهبود سریع‌تر سرطان استفاده نمود. هدف از این مطالعه ارزیابی نقش پروآپوپتوزی انتروتوکسین B استافیلوکوکی در

در (Gibco, USA) (Penicillin-Streptomycin) Penstrep 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 ۵×۱۰^۶ سلول MCF-7، درون سه چاهک از پلیت شش چاهکی کشت داده شد. سپس با استفاده از معرف لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (USA, Invitrogen)، سلول‌ها در چاهک‌های اول و دوم به ترتیب توسط، pcDNA3.1(+)-*seb* (به عنوان پلاسمید نوترکیب) و (+)pcDNA3.1 (به عنوان پلاسمید کنترل)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده ترانسفورم شدند (افزودن ۴μg 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، (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. به منظور 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 به منظور 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 ساب کلون گردید. وکتورهای (+)pcDNA3.1 (*seb* نوترکیب) و (+)pcDNA3.1 (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

تاثیر برنامه دمایی زمانی به شرح زیر قرار گرفتند: مرحله Initial denaturation: مدت زمان چهار دقیقه، دما 95°C ، یک سیکل. مرحله Denaturation: مدت زمان ۱۵ ثانیه، دما 95°C ، ۴۰ سیکل. مرحله Annealing: مدت زمان ۲۰ ثانیه برای هر هفت ژن، دمای 64°C برای ژن های *FAS* و *GAPDH* و دمای 65°C برای ژن های *Seb*، *BCL-2*، *BAX* و *TNF-a* و دمای 66°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 مورد نظر از روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (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 $p < 0/05$ معنی دار محسوب گردید.

ملاحظات اخلاقی

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

شده، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر محتوی سه میکرولیتر cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر $10\times$ ، 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 94°C درجه سانتی گراد، Denaturation به مدت یک دقیقه در دما 94°C درجه سانتی گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دما 56°C درجه سانتی گراد و Final Extension به مدت پنج دقیقه در دما 72°C 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*، *BAX*، *TNF-a*، *BCL-2*، *Survivin* 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

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	5'-AGGACACAAAGGTGGGCAACTAC-3'	۶۵	۱۷۱
	پسرو	5'-TACGCTTGTCTGTCTGGTGGGAG-3'		
<i>BCL-2</i>	پیشرو	5'-GACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3'	۶۵	۲۴۵
	پسرو	5'-CGGTTTCAGTACTCAGTCATCCAC-3'		
<i>BAX</i>	پیشرو	5'-AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC-3'	۶۵	۲۳۴
	پسرو	5'-GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG-3'		
<i>FAS</i>	پیشرو	5'-CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC-3'	۶۴	۱۶۳
	پسرو	5'-GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC-3'		
<i>BAK</i>	پیشرو	5'-CGTTTTTACCGCCATCAGCAG-3'	۶۶	۱۵۴
	پسرو	5'-ATAGCGTCGGTTGATGTCGTCC-3'		
<i>TNF-a</i>	پیشرو	5'-GCCTCTTCTCCTTCTGATCGTG-3'	۶۵	۱۸۴
	پسرو	5'-TTTGCTACAACATGGGCTACAGG-3'		
<i>GAPDH</i>	پیشرو	5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3'	۶۴	۱۸۳
	پسرو	5'-GGTCACGAGTCCTCCACGATAC-3'		
<i>Survivin</i>	پیشرو	5'-AGAAGTGGCCCTTCTTGGAGG-3'	۶۴	۱۷۰
	پسرو	5'-CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'		

جدول ۲: مقادیر واکنش‌گرهای RT-Real Time PCR

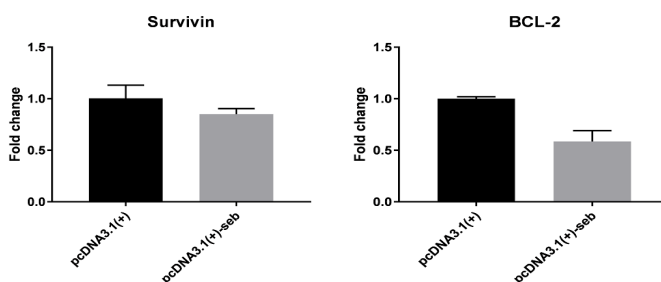
غلظت نهایی	حجم	ترکیبات
کمتر از ۱۰۰ نانوگرم/واکنش	۲ میکرولیتر	cDNA
۱۰ پیکومول	۰/۱۵ میکرولیتر	پرایمر Forward
۱۰ پیکومول	۰/۱۵ میکرولیتر	پرایمر Reverse
-	۶/۲ میکرولیتر	RNase-free water
X۲	۱۰ میکرولیتر	SYBR
-	۱/۵ میکرولیتر	کلرید منیزیم
-	۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی

میزان بیان ژن‌های *TNF-a*, *BAX*, *FAS*, *BAK*، *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 *TNF-a*، *BAX*، *FAS*، *BAK* در سلول‌های MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب در مقایسه با سلول‌های کنترل بود (نمودار ۱ و ۲).

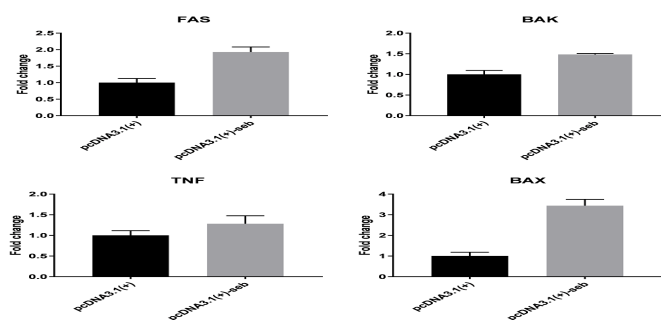
نتایج

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



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 *FAS*, *BAK*, *TNF-a* و *BAX* بر اساس Ct. بیان ژن های *FAS*, *BAK*, *TNF-a* در سلول های MCF-7 ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب 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 انترتوکسین B و آلفاتوکسین هر دو از طریق مکانیسم مشابهی یعنی از طریق مسیر خارجی و با دخالت $TNF-\alpha$ 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 آگزوزوم و انترتوکسین 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 آگزوزوم انترتوکسین 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 انترتوکسین 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- انترتوکسین B دارای خواص سمیت سلولی بر روی سلول های مورد بررسی می باشد (۲۲). در سال ۲۰۱۶، خاصیت آپوپتوزی انترتوکسین B استافیلوکوکی را در سلول های THP-1 مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که انترتوکسین B قادر است از طریق فعال سازی کسپازها آپوپتوز را در سلول های THP-1 القاء نماید (۱۳). در مطالعه حاضر نیز توانایی انترتوکسین 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 سرخکی، 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 کلاستریدیا از عوامل بالقوه ضد سرطان می باشند (۱۷، ۱۸). در سال ۲۰۱۲، درمان ملانوم متاستاتیک با سالمونلا تیفی موریوم آگزوتروفیک، 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 انترتوکسین 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 انترتوکسین 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, Homae 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-A*, *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-A*, *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