BRIEF REPORT

Effect of Heat-killed Saccharomyces cerevisiae on Growth Rate and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells

Roshanak Sambrani[1],
Jalal Abdolalizadeh[2],
Leila Kohan[3],
Behboud Jafari[4]

[1] Department of Genetics, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
[2] Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

(Received December 16, 2019 ; Accepted July 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Colorectal cancer (CRC) is highly prevalent and conventional therapies are associated with side effects, therefore, application of novel complementary treatment such as probiotics (especially *Saccharomyces cerevisiae*) is necessary. The aim of this study was to investigate the effect of heat-killed form of *S.cerevisiae* on growing rate and apoptosis (expression levels of PTEN and RelA) in colon cancer cell line HT29.

Materials and methods: In this experimental study, the cytotoxic effects of heat-killed form of *S.cerevisiae* and Fluorouracil (5-FU), as positive control, were tested by MTT assay. Apoptosis induction was investigated by determining the PTEN and RelA expression levels using qRT-PCR. Data were analyzed in GraphPad Prism Software.

Results: Heat killed form of *S.cerevisiae* showed anti-proliferative and apoptotic effect by decreasing the expression levels of RelA and increasing PTEN expression levels in HT-29 cells. The expression levels were found to be significantly different between the intervention groups and controls.

Conclusion: The yeast probiotics could decrease the growth rate of colorectal cancer cells and play key role in induction of apoptosis via regulation of RelA and PTEN.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, apoptosis, colorectal cancer, probiotics

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (189): 133-139 (Persian).

* **Corresponding Author: Jalal Abdolalizadeh -** Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (E-mail: jabdolalizadeh@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 189 مهر سال 1399 (139-133)

تاثیر ساکارومایسس سرویزیه کشته شده با حرارت بر روی سرعت رشد و آپوپتوز در سلول های سرطانی کولورکتال

روشنک سامبرانی[1]
جلال عبدالعلیزاده[2]
لیلا کهن[3]
بهبود جعفری[4]

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل شیوع بالای سرطان کولورکتال و عوارض جانبی متعدد در درمان‌های مرسوم، استفاده از درمان‌های جدید با استفاده از پروبیوتیک‌ها مانند ساکارومایسس سرویسیه ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر فرم کشته شده مخمر بر روی سرعت رشد و مسیر آپوپتوز (بیان ژن PTEN و RelA) در رده سلولی HT-29 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اثرات سمیت سلولی مخمر کشته شده و داروی 5-FU (کنترل مثبت) با روش MTT اندازه‌گیری شد. میزان بیان mRNA دو ژن مدنظر با روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد آنالیز شد.

یافته‌ها: فرم کشته شده مخمر دارای اثرات مهار رشد و القای آپوپتوز بود که از طریق کاهش بیان Rel A و افزایش بیان PTEN در رده سلولی سرطانی مشاهده شد. این تاثیرات در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.

استنتاج: مخمرهای پروبیوتیک قادر به کاهش سرعت رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال می باشند و می توانند در القای آپوپتوز به واسطه دخالت در مسیر پیام رسانی Rel A و PTEN نقش داشته باشند.

واژه های کلیدی: ساکارومایسس سرویزیه، آپوپتوز، سرطان کولورکتال، پروبیوتیک

مقدمه

یکی از سرطان‌های شایع در دنیا و بخصوص ایران سرطان کولورکتال می‌باشد که چهارمین علت شایع مرگ ناشی از سرطان عنوان شده است(1). یکی از داروهای شیمی درمانی مورد استفاده برای درمان، 5- فلورواوراسیل (5-FU) می‌باشد، اما مقاومت دارویی و عوارض جانبی متعددی در مورد این دارو گزارش شده است. عوارض جانبی روش‌های درمانی از یک طرف و تاثیر تعادل میکروبیوم روده در ایجاد سرطان‌ها، تلاش‌ها را در جهت نظیم میکروفلور سیستم گوارشی سوق داده تا روشی با عارضه جانبی کم‌تر برای درمان و پیشگیری از سرطان کشف شود. یکی از این روش‌های جدید بکارگیری درمان‌های کمکی مانند پروبیوتیک‌ها می‌باشد(2).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به تعداد معینی وارد بدن شوند اثرات سودمندی برای

مولف مسئول: جلال عبدالعلی زاده - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی E-mail: jabdolalizadeh@gmail.com
1. گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
2. دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
3. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران
4. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
تاریخ دریافت : 1398/9/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/10/4 تاریخ تصویب : 1399/4/15

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

میزبـان خـود بـه جـای خواهنـد گذاشـت(3). اغلـب پروبیوتیـک‌هـا متعلـق بـه بـاکتری‌هـای لاکتیـک اسـید (لاکتوباسیلوس‌هـا، بیفیـدوباکترها)، انتروکوکـوس‌هـا و مخمر ساکارومایسس می‌باشند(5،4). در این میـان، نقـش ساکارومایسس سرویزیه (مخمر نانوایی) به عنوان مخمـر غیر بیماریزا و ساکن طبیعی دستگاه گوارش و پوست در کـاهش التهـاب، مهـار رشـد و القـای آپوپتـوز از طریـق مکانیسم‌های سیگنالی مختلـف در سـلول‌هـای سـرطانی گزارش شده اسـت(۷،۶). القـای آپوپتـوز در سـلول‌هـای سرطانی وابسته بـه فعـال شـدن زیرواحـدهای مسـیرهای پیام‌رسانی Akt/PTEN و NF-kB می‌باشـد. فعـال شـدن ژن PTEN (مهارکننـده تومـور) در مسـیر سـیگنالینگ Akt/PTEN و ژن RelA در مسیر NF-kB ، باعث مهـار تکثیر سلول‌های سـرطانی کولورکتـال، القـای آپوپتـوز، القـای توقـف G2/M چرخـه سـلولی مـی‌شـود(9،8). مطالعات نشان می‌دهنـد پروبیوتیـک‌هـا و اجـزای آن‌هـا برای اعمال اثر ضد سرطانی خـود ایـن مسـیرها را مـورد هدف قرار می‌دهنـد(11،10). امـا مکـانیزم مولکـولی اثـر پروبیوتیـک‌هـا بـه‌خصـوص مخمرهـا در مهـار سـرطان کولورکتال به طور کامل شـناخته نشـده اسـت و نیازمنـد مطالعات بیش‌تر می‌باشد. از این‌رو بـا توجـه بـه تـاثیرات مثبت مخمرهای پروبیوتیـک در سـلامت انسـان، هـدف از ایـن مطالعـه تعیـین تـاثیر ساکارومایسـس سـرویزیه کشته شده با حرارت بر میـزان رشـد و القـاء آپوپتـوز در سـلول‌هـای سـرطانی کولورکتـال (رده سـلولی HT-29) می‌باشد که نتایجش در این مقالـه آورده شـده عـلاوه از این ما تاثیر سوپرناتانت به‌دست آمده از ساکارومایسـس سرویزیه زنده را نیز روی این سلول‌هـا و ژن‌هـای دیگـر بررسـی نمـوده‌ایـم کـه در مقالـه‌ای دیگـر منتشـر شـده است(12).

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی HT29 (تهیه شـده از ذخیره سلولی انستیتوپاستور ایـران) در محـیط کشـت RPMI (حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سـیلین و FBS 10%) کشت داده شـد ($5\% CO_2$, 37 °C)(13). سپس ساکارومایسس سـرویزیه (PTCC 5052) در محـیط کشت مخصوص YPD (yeast extract peptone dextrose) در انکوباتور شیکر دار (150 rpm) فعال شد (16h,30 °C). تک کلون مخمر در محیط مـایع کشـت داده شـد تـا بـه OD_{600}=1 (1×10^6 cell/ml) برسد. محیط کشت حـاوی مخمـر سـانتریفیوژ (1000 g, 10 min, 4 °C) و رسـوب حاصل 3 بار با بافر فسـفات سـالین شسـته شـد و رسـوب حاصل داخل حمام آب گرم (1h,95°C) قرارگرفـت تـا فرم کشته شده بدست بیایـد. اطمینـان از کشـته شـدن بـا رشد مخمرهـا (100µl) در پلیـت YPD (3days, 30°C) حاصـل شـد. تـا اجـرای آزمایشـات، مخمـر (*Saccharomyce cerevisiae:S.C*) در 4 °C و به‌صورت طـولانی مـدت در 70 °C- نگهـداری شـد(14). بررسـی سمیت *S.C* بر روی سلول‌هـای سـرطانی بـا روش MTT ارزیابی شد. سلول‌ها (حدودا 7000 سلول) با غلظت‌هـای متفـاوت از S.C OD_{600}=1 (0/016، 0/031، 0/063، 0/13، 0/25 و 0/5) و داروی 5-FU به‌عنوان کنترل مثبت (25، ۵۰،۱۰۰، ۵۰۰،۴۰۰،۲۰۰و600 میلی‌گرم بر میلی‌لیتـر) در پلیت 96 خانه‌ای تیمار شد و بعـد از 24 و 48 سـاعت درصد زنده مانی سلول‌ها وIC_{50} تعیین شد.

IC_{50} ، غلظتـی از یـک دارو یـا یـک مـاده مؤثره می‌باشد کـه 50 درصـد رشـد سـلول را نسـبت بـه گروه کنترل مهار کند. به این ترتیـب کـه بعـد از خـالی کـردن محـیط چاهـک‌هـا، محـیط کشـت سـلولی تـازه (150µl) و محلول MTT (50 µl, 2 mg/ml) اضافه شـد و به‌مدت 4 ساعت در انکوباتور کشت سلولی نگهـداری شدند. سـپس محـیط پلیـت‌هـا تخلیـه و بـه هـر چاهـک ایزوپروپـانول (100µl) افـزوده شـد تـا کریسـتال‌هـای فورمازان به فرم محلـول تبـدیل شـوند (15min, 37°C). جـذب نـوری (طـول مـوج 570 نـانومتر) بـا دسـتگاه الایـزا ریـدر Awareness Technology Stat fax-2100 اندازه‌گیری شـد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

بررسی بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR صورت گرفت. ابتدا به هر چاهک از پلیت 6 خانه، سلول HT-29 (1×10^5 cell) ریخته شد. بیان ژن‌های مورد نظر در سه گروه تیماری در دو زمان 24 و 48 ساعت مورد آنالیز قرارگرفت: سلول تیمار شده با دوز IC_{50} از5-FU، سلول تیمار شده با IC_{50} از S.c و گروه کنترل (سلول‌های بدون تیمار). استخراج RNA توسط کیت (RNXTM-PLUS) طبق پروتکل ساخت کارخانه انجام و کیفیت آن بررسی شد. جهت تهیه cDNA از RNA استخراج شده، از کیت سیناکلون استفاده شد و میزان بیان ژن‌ها و ژن کنترل داخلی (GAPDH) با سایبرگرین و کیت Master Mix SYBR انجام شد. آنالیز نتایج با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. توالی پرایمرها در جدول شماره 1 آورده شده است.

جدول شماره 1: توالی پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR

ژن	پرایمر برگشت : R و پرایمررفت:F (توالی 3'→5')	اینلینگ حرارت(°C)
PTEN	F: TCGACTACTTGCTTTGTAGA R : TTTACAGCCCCGATTGGGCT	60
Rel A	F: CCAGACCAACAACAACCCCT R: TCACTCGGCAGATCTTGAGC	61
GAPDH	F: AAGCTCATTTCCTGGTATGACAACG R: TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG	63

تحلیل وآنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (سه تکرار) نشان داده شد. اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه با روش ANOVA یک طرفه مورد آنالیز قرار گرفت. در تمامی بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد، همچنین جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار گرف پد پریزم 6 استفاده شده است.

یافته ها و بحث

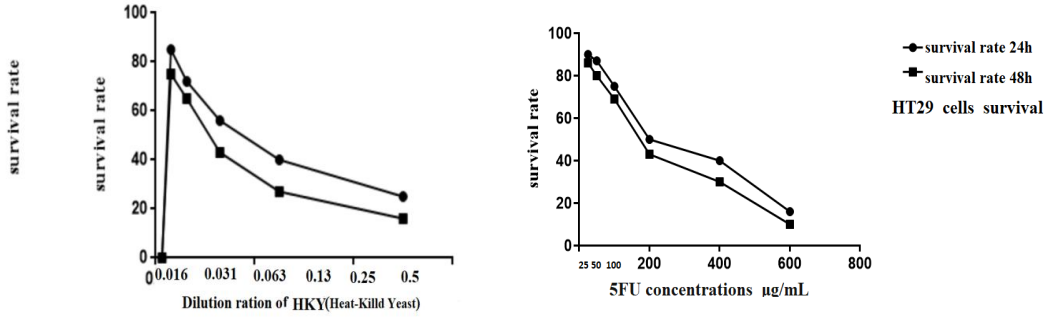
مخمر ساکارومایسس به فرم کشته شده با حرارت (S.c)، 5-FU به عنوان داروی کنترل مثبت و سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل منفی در این مطالعه انتخاب شدند. تعیین غلظت مهاری با تعیین IC50 و با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، IC50 مخمر در 24 ساعت و 48 ساعت حدود 0/031 و برای داروی 5-FU در غلظت 200µg/ml محاسبه گردید. درصد بقای سلول‌ها با حداکثر غلظت مخمر در غلظت 0/5 µg/ml (زنده مانی 20 درصد) و با حداکثر غلظت 5-FU در 600 µg/ml (زنده مانی کم‌تر از 20 درصد) مشاهده شد (نمودار شماره 1). RAJAN و همکارانش به بررسی تاثیر S.c بر روی سلول‌های Hela پرداختند. طبق نتایج روش MTT، تیمار با دوزهای مختلف و در سه زمان (24، 48 و72 ساعت)، منجر به سمیت سلولی به صورت وابسته به دوز و زمان شد و موجب مهار رشد سلول های سرطانی شد که با نتایج حاصل از مطالعه ما مطابقت داشت(15).

ژن PTEN نوعی تومور ساپرسور است که با افزایش میزان آن سلول‌های سرطانی به سوی آپوپتوز پیش می‌روند. این ژن در مسیر سیگنالینگ PTEN/AKT فعال شده و موجب بقای سلول‌ها می‌شود. در این مطالعه میزان بیان ژن PTEN در طول 24 و 48 ساعت تیمار با S.c افزایش نشان داد. اختلاف معنی‌داری مابین افزایش بیان در دو گروه مخمر و داروی 5-FU مشاهده نشد (نمودار شماره 2). زنوزی و همکاران با تیمار پروبیوتیک‌ها بر روی سلول‌های سرطانی کولورکتال HT-29، کاهش میزان بیان ژن AKT را گزارش نمودند اما تغییری در میزان بیان PTEN مشاهده نشده بود(16). علاوه بر این مسیر، نقش پیام‌رسانی مسیر NF-KB (فعال شدن زیر واحدهای RelA,IKB) در تکثیر سلولی، التهاب و آپوپتوز به اثبات رسیده است(15). در مطالعه حاضر با افزایش غلظت تیمار با S.c، میزان بیان ژن RelA کاهش معنی‌داری نشان داد که با مطالعه زنوزی و همکاران در راستای کاهش میزان این ژن و القای آپوپتوز مطابقت داشت (نمودار شماره 2).

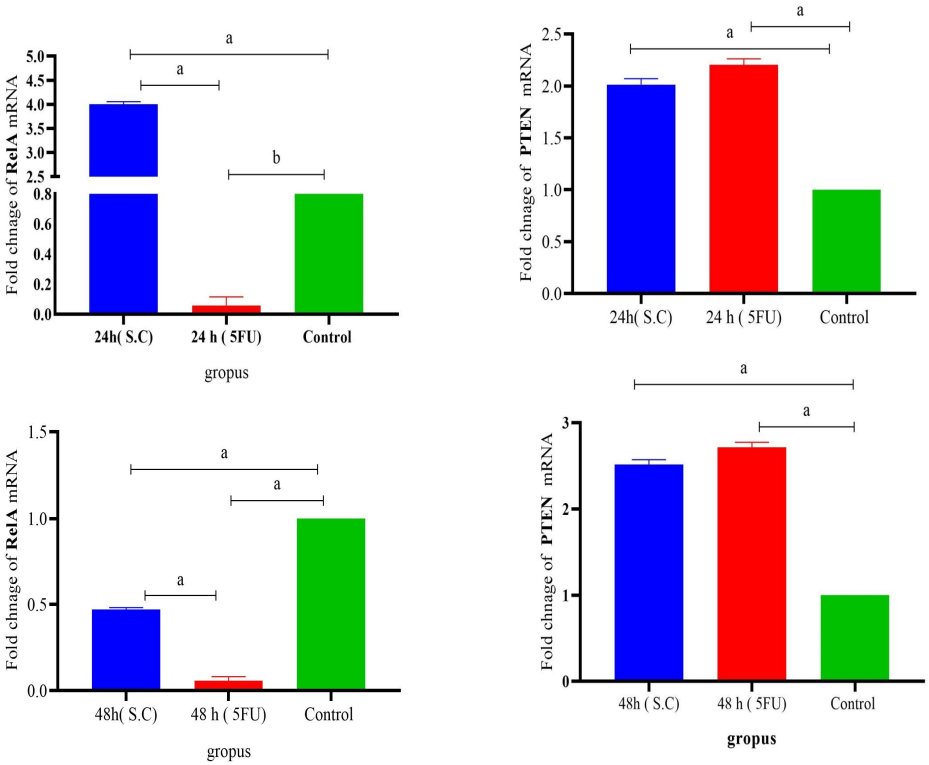
در مطالعات پیشین اثر ضد سرطانی ساکارومایسس بر روی سلول‌های سرطانی (با کاهش RelA، افزایش بیان کاسپازها) گزارش شده است که با مطالعه حاضر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

همخوانی داشت(17). سامبرانی و همکاران در مطالعه‌ای سوپرناتانت حاصل از کشت همجوار ساکارمایسس سرویزیه زنده و سلول‌های سرطانی کولورکتال را بررسی کردند و نتایج نشان داد که سوپر ناتانت به دست آمده از ساکارومایسس سرویزیه می‌تواند درتوقف رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال و نیز جلوگیری از مهاجرت سلول‌های سرطانی، موثر باشد(12). در مطالعه حاضر تاثیر ساکارومایسس سرویسیه کشته شده با حرارت و داروی 5-FU در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال HT29 بررسی شد و تاثیر آن به صورت افزایش بیان ژن PTEN و کاهش بیان RelA مشاهده گردید.



نمودار شماره 1: تاثیر غلظت های مخمر و داروی 5-FU بر بقای سلول های HT29 (نتایج بصورت میانگین و انحراف معیار در سه تکرار ارائه شده است و مقادیر عددی IC50 با رگرسیون غیرخطی محاسبه شده است).



نمودار شماره 2: میزان بیان ژن PTEN و RelA بعد از تیمار با مخمر کشته شده (S.C) و داروی 5-FT در 24 و 48 ساعت (a :P <0/0001، b :P <0/001).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی دکتری دانشجو روشنک سامبرانی است در این تحقیق از نمونه‌های انسانی یا حیوانی استفاده نشده و از رده سلولی جهت انجام این پژوهش استفاده شده است کد اخلاقی این پژوهش IR.IAU.M.REC.139407 می باشد. در این مطالعه از همکاری مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس و دانشگاه آزاد واحد مرودشت تشکر می شود.

References

1. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Disparities in Latinos: Genes vs. Environment. Advancing the Science of Cancer in Latinos: Springer; 2020. 35-41.
2. Ambalam P, Raman M, Purama RK, Doble M. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2016; 30(1): 119-131.
3. Daniluk U. Probiotics, the new approach for cancer prevention and/or potentialization of anti-cancer treatment. J Clin Exp Oncol 2012; 1: 2.
4. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review Article: yeast as probiotics–Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol Ther 2007; 26(6): 767-778.
5. Nami Y, Vaseghi Bakhshayesh R, Mohammadzadeh Jalaly H, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Frontiers In Microbiology 2019; 10: 300 (Persian).
6. Abedi J, Saatloo MV, Nejati V, Hobbenaghi R, Tukmechi A, Nami Y, et al. Selenium-enriched Saccharomyces cerevisiae reduces the progression of colorectal cancer. Biol Trace Elem Res 2018; 185(2): 424-432 (Persian).
7. Feldmann H. Yeast: molecular and cell biology: John Wiley & Sons; 2011.
8. Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. Mol Cell Biol 2004; 24(3): 1007-1021.
9. Buchholz TA, Garg AK, Chakravarti N, Aggarwal BB, Esteva FJ, Kuerer HM, et al. The nuclear transcription factor kappaB/bcl-2 pathway correlates with pathologic complete response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer .Clin Cancer Res 2005; 11(23): 8398-8402.
10. Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'agata V, Malaguarnera M, Bertino G, et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. BMC Surgery 2012; 12(S1): S35.
11. Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. The Role of Probiotics in Colorectal Cancer Management. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2020; 2020.
12. Sambrani R, Abdolalizadeh J, Kohan L, Jafari B. Saccharomyces cerevisiae inhibits growth and metastasis and stimulates apoptosis in HT-29 colorectal cancer cell line. Comp Clin Pathol 2019; 28(4): 985-995.
13. Wright K, Kolios G, Westwick J, Ward SG. Cytokine-induced apoptosis in epithelial HT-29 cells is independent of nitric oxide formation evidence for an interleukin-13-driven phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival mechanism. J Biol Chem 1999; 274(24): 17193-17201.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]

14. Capilla J, Clemons KV, Liu M, Levine HB, Stevens DA. Saccharomyces cerevisiae as a vaccine against coccidioidomycosis. Vaccine 2009; 27(27): 3662-3668.
15. Rajan T, Benluvankar V, Vincent S. Saccharomyces cerevisiae-induced apoptosis of monolayer cervical cancer cells. Asian J Pharm Clin Res 2017; 10(8): 63-66.
16. Zununi Vahed S, Barzegari A, Rahbar Saadat Y, Goreyshi A, Omidi Y. Leuconostoc mesenteroides- derived anticancer pharmaceuticals hinder inflammation and cell survival in colon cancer cells by modulating NF-κB/AKT/PTEN/MAPK pathways. Biomed Pharmacother 2017; 94: 1094-1100.
17. Gharamaleki AS, Alipour B, Faghfoori Z, YariKhosroushahi A. Prophylactic effects of dairy Kluyveromyces marxianus YAS through overexpression of BAX, CASP 3, CASP 8 and CASP 9 on human colon cancer cell lines. Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng 2016; 10: 142-152 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-17]