

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

Roshanak Sambrani¹,
Jalal Abdolalizadeh²,
Leila Kohan³,
Behboud Jafari⁴

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)

تاثیر ساکارومايسس سرويزيه كشته شده با حرارت بر روي سرعت رشد و آپوپتوز در سلول های سرطانی كولوركتال

روشنك سامبراني¹

جلال عبدالعزیزاده²

لیلا کهن³

بهبود جعفری⁴

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل شیوع بالای سرطان كولوركتال و عوارض جانبی متعدد در درمان‌های مرسوم، استفاده از درمان‌های جدید با استفاده از پروبیوتیک‌ها مانند ساکارومايسس سرويزيه ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر فرم كشته شده مخمر بر روي 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 كشته 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 كشته 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 كولوركتال می‌باشند و می‌توانند در القای آپوپتوز به واسطه دخالت در مسیر پیام‌رسانی Rel A و PTEN نقش داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: ساکارومايسس سرويزيه، آپوپتوز، سرطان كولوركتال، پروبیوتیک

مقدمه

میکروبیوم روده در ایجاد سرطان‌ها، تلاش‌ها را در جهت تنظیم 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

یکی از سرطان‌های شایع در دنیا و بخصوص ایران سرطان كولوركتال می‌باشد که چهارمین علت شایع مرگ ناشی از سرطان عنوان شده است (1). یکی از داروهای شیمی درمانی مورد استفاده برای درمان، 5-فلورواوراسیل (FU-5) 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

E-mail: jabdolalizadeh@gmail.com

مؤلف مسئول: جلال عبدالعزیزاده - تبریز: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی

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

میزبان خود به جای خواهند گذاشت (3). اغلب پروبیوتیک‌ها متعلق به باکتری‌های لاکتیک اسید (لاکتوباسیلوس‌ها، بیفیدوباکترها)، انتروکوکوس‌ها و مخمر ساکارومایسس می‌باشند (5,4). در این میان، نقش ساکارومایسس سرویزیه (مخمر نانوائی) به عنوان مخمر غیر بیمارزا و ساکن طبیعی دستگاه گوارش و پوست در کاهش التهاب، مهار رشد و القای آپوپتوز از طریق مکانیسم‌های سیگنالی مختلف در سلول‌های سرطانی گزارش شده است (۷,۶). القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی وابسته به فعال شدن زیرواحدهای مسیرهای پیام‌رسانی Akt/PTEN و NF-kB می‌باشد. فعال شدن ژن PTEN (مهارکننده تومور) در مسیر سیگنالینگ Akt/PTEN و ژن RelA در مسیر NF-kB، باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی کولورکتال، القای آپوپتوز، القای توقف G2/M چرخه سلولی می‌شود (9,8). مطالعات نشان می‌دهند پروبیوتیک‌ها و اجزای آن‌ها برای اعمال اثر ضد سرطانی خود این مسیرها را مورد هدف قرار می‌دهند (11,10). اما مکانیزم مولکولی اثر پروبیوتیک‌ها به خصوص مخمرها در مهار سرطان کولورکتال به طور کامل شناخته نشده است و نیازمند مطالعات بیش‌تر می‌باشد. از این‌رو با توجه به تأثیرات مثبت مخمرهای پروبیوتیک در سلامت انسان، هدف از این مطالعه تعیین تأثیر ساکارومایسس سرویزیه کشته شده با حرارت بر میزان رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کولورکتال (رده سلولی HT-29) می‌باشد که نتایجش در این مقاله آورده شده علاوه از این ما تأثیر سوپرناتانت به‌دست آمده از ساکارومایسس سرویزیه زنده را نیز روی این سلول‌ها و ژن‌های دیگر بررسی نموده‌ایم که در مقاله‌ای دیگر منتشر شده است (12).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی HT29 (تهیه شده از ذخیره سلولی انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت

RPMI (حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین و 10% FBS) کشت داده شد ($5\% \text{ CO}_2$, 37°C) (13). سپس ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5052) در محیط کشت مخصوص YPD (yeast extract peptone dextrose) در انکوباتور شیکر دار (150 rpm) فعال شد (16h , 30°C). تک کلون مخمر در محیط مایع کشت داده شد تا به $\text{OD}_{600}=1$ ($1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$) برسد. محیط کشت حاوی مخمر سانتریفیوژ (1000 g , 10 min , 4°C) و رسوب حاصل 3 بار با بافر فسفات سالین شسته شد و رسوب حاصل داخل حمام آب گرم (1h , 95°C) قرار گرفت تا فرم کشته شده بدست بیاید. اطمینان از کشته شدن با رشد مخمرها ($100\mu\text{l}$) در پلیت YPD (3days , 30°C) حاصل شد. تا اجرای آزمایشات، مخمر (*Saccharomyce cerevisiae*: S.C) در 4°C و به‌صورت طولانی مدت در 70°C - نگهداری شد (14). بررسی سمیت S.C بر روی سلول‌های سرطانی با روش MTT ارزیابی شد. سلول‌ها (حدوداً 7000 سلول) با غلظت‌های متفاوت از S.C ($\text{OD}_{600}=1$) (0/063, 0/031, 0/016, 0/025, 0/5 و 0/25) و داروی 5-FU به‌عنوان کنترل مثبت ($25, 50, 100, 200, 400, 600$ میلی گرم بر میلی لیتر) در پلیت 96 خانه‌ای تیمار شد و بعد از 24 و 48 ساعت درصد زنده ماندی سلول‌ها و IC_{50} تعیین شد.

IC_{50} ، غلظتی از یک دارو یا یک ماده مؤثره می‌باشد که 50 درصد رشد سلول را نسبت به گروه کنترل مهار کند. به این ترتیب که بعد از خالی کردن محیط چاهک‌ها، محیط کشت سلولی تازه ($150\mu\text{l}$) و محلول MTT ($50 \mu\text{l}$, 2 mg/ml) اضافه شد و به مدت 4 ساعت در انکوباتور کشت سلولی نگهداری شدند. سپس محیط پلیت‌ها تخلیه و به هر چاهک ایزوپروپانول ($100\mu\text{l}$) افزوده شد تا کریستال‌های فورمازان به فرم محلول تبدیل شوند (15min , 37°C). جذب نوری (طول موج 570 نانومتر) با دستگاه الایزا ریدر Awareness Technology Stat fax-2100 اندازه‌گیری شد.

بررسی بیان ژن ها با روش qRT-PCR صورت گرفت. ابتدا به هر چاهک از پلیت 6 خانه، سلول HT-29 (1×10^5 cell) ریخته شد. بیان ژن های مورد نظر در سه گروه تیماری در دو زمان 24 و 48 ساعت مورد آنالیز قرار گرفت: سلول تیمار شده با دوز IC_{50} از 5-FU، سلول تیمار شده با IC_{50} از S.c و گروه کنترل (سلول های 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 ژن ها و ژن کنترل داخلی (GAPDH) با سایر گرین 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 برکشت: R و پرایمر رفت: F	پلیتنگ
		حرارت (°C)
PTEN	F: TCGACTACTTGCTTTGTAGA R: TTACAGCCCCGATTTGGGCT	60
Rel A	F: CCAGACCAACAACAACCCCT R: TCACTCGGCAGATCTTGAGC	61
GAPDH	F: AAGCTCATTTCTGCTGATGACAACG R: TCTTCCTCTTGCTCTCTGCTGG	63

تحلیل و آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (سه تکرار) نشان داده شد. اختلاف بین گروه های مورد مطالعه با روش ANOVA یک طرفه مورد آنالیز قرار گرفت. در تمامی بررسی ها سطح معنی دار آزمون ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد، همچنین جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار گراف 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 سلول های تیمار نشده به عنوان کنترل منفی در این مطالعه انتخاب شدند. تعیین غلظت مهاري با تعیین IC_{50} و با تست

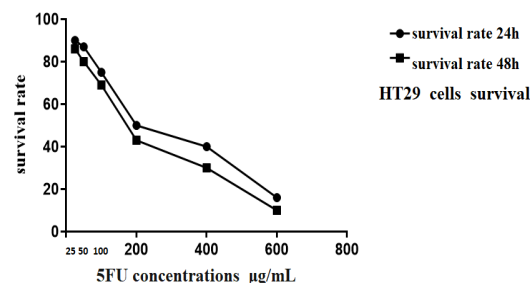
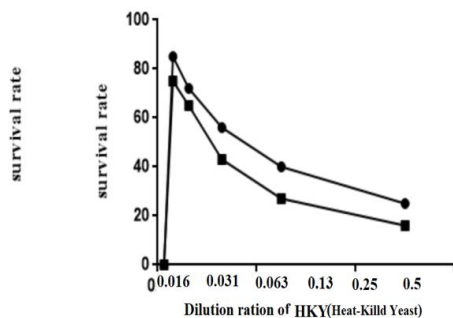
MTT مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، IC_{50} مخمر در 24 ساعت و 48 ساعت حدود 0/031 و برای داروی 5-FU در غلظت 200 $\mu\text{g/ml}$ محاسبه گردید. درصد بقای سلول ها با حداکثر غلظت مخمر در غلظت 0/5 $\mu\text{g/ml}$ (زنده مانی 20 درصد) و با حداکثر غلظت 5-FU در 600 $\mu\text{g/ml}$ (زنده مانی کم تر از 20 درصد) مشاهده شد (نمودار شماره 1). RAJAN و همکارانش به بررسی تأثیر S.c بر روی سلول های Hela پرداختند. طبق نتایج روش MTT، تیمار با دوزهای مختلف و در سه زمان (24، 48 و 72 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 سلول های سرطانی به سوی آپوپتوز پیش می روند. این ژن در مسیر سیگنالینگ PTEN/AKT فعال شده و موجب بقای سلول ها می شود. در این مطالعه میزان بیان ژن PTEN در طول 24 و 48 ساعت تیمار با S.c افزایش نشان داد. اختلاف معنی داری مابین افزایش بیان در دو گروه مخمر و داروی 5-FU مشاهده نشد (نمودار شماره 2). زنوزی و همکاران با تیمار پروبیوتیک ها بر روی سلول های 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 پیام رسانی 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 معنی داری نشان داد که با مطالعه زنوزی و همکاران در راستای کاهش میزان این ژن و القای آپوپتوز مطابقت داشت (نمودار شماره 2).

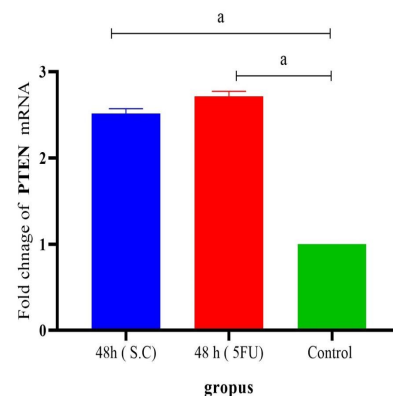
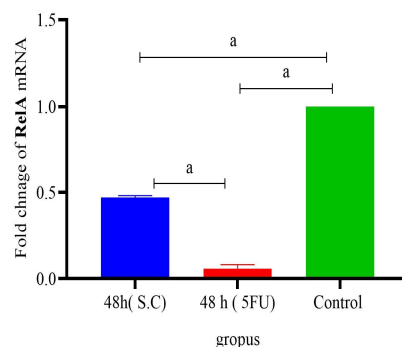
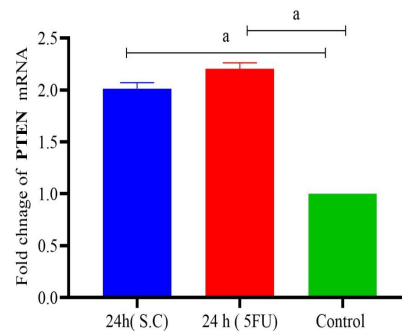
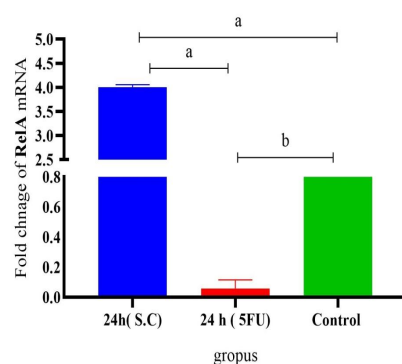
در مطالعات پیشین اثر ضد سرطانی ساکارومایسس بر روی سلول های سرطانی (با کاهش RelA، افزایش بیان کاسپازها) گزارش شده است که با مطالعه حاضر

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 سوپرناتانت به دست آمده از ساکارمایسس سرویزیه می‌تواند در توقف رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال و نیز جلوگیری از

مهاجرت سلول‌های سرطانی، موثر باشد (12). در مطالعه حاضر تاثیر ساکارمایسس سرویزیه 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 غلظت‌های مخمر و داروی 5-FU بر بقای سلول‌های 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-FU در 24 و 48 ساعت (a: $P < 0.0001$, b: $P < 0.001$).

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی دکتری دانشجو روشنگر سامبرانی است در این تحقیق از نمونه های 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.

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, Omid Y. *Leuconostoc mesenteroides*- derived anticancer pharmaceuticals hinder inflammation and cell survival in colon cancer cells by modulating NF- κ B/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).