بررسی اثر پروبیوتیکی *Bifidobacterium bifidum* بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII

حمیده محمودی اصل زاده*[۱،]، محمد رضا فاضلی[۲]، اکرم عیدی[۱]، نسرین صمدی[۲]، حسین جمالی فر[۲]، لادن پارساسرشت[۱]

[۱] **تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۲] **تهران، دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو وغذا**

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۸

چکیده

پروبیوتیکها مکمل خوراکی میکروبی زنده هستند . اثرات مفید مختلفی به پروبیوتیکها نسبت داده می شود. جالب ترین و بحث انگیزترین این اثرات در خصوص اثر پروبیوتیکها بر روی سرطان می باشد. در این تحقیق اثر پروبیوتیکی *Bifidobacterium bifidum* روی سلولهای سرطانی CacoII (رده سلولی سرطانی روده بزرگ) بررسی شد . برای این کار محیط کشت آبگوشتی MRS از باکتری*Bifidobacterium bifidum* آماده و از کشتهای ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت، دو سوپرناتانت تهیه شد به طوری که یکی از سوپرناتانت ها دارای pH اسیدی(pH=۴) و یکی از آنها توسط 1N NaOH خنثی شد(pH= ۷). غلظتهای ۲۰۰،۱۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر از سوپرناتانت ها روی سلولهای سرطانی CacoII کشت شده در میکروپلیت ۹۶ خانه ای اثر داده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در صد مهاری سوپرناتانت*Bifidobacterium bifidum* روی سلولهای سرطانی ، ۵۵ درصد تا ۸۲ درصد بوده که مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرولیتر / میلی لیتر (۲۴ ساعت) و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر (۷۲ ساعت) بوده است. اثر مهاری سوپرناتانت ها رابطه مستقیم با غلظت داشت و مستقل از اسیدی بودن سوپرناتانت ها بود .

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، *Bifidobacterium bifidum* ، سرطان کولون،سلولهای CacoII

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۳۶۰۸۰۲ ، پست الکترونیکی: hamide.mahmudi2008@yahoo.com

مقدمه

سرطان روده بزرگ مسئله جدی سلامت است و عامل بیشترین مرگ و میر سرطان در دنیاست.عوامل موثر در سرطان روده بزرگ عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی است که رژیم غذایی نامناسب شامل چربی زیاد، فیبر کم ،کربوهیدرات کم از عوامل محیطی ایجاد کننده می باشد (۶ و ۹).

طیف وسیعی از گونه های باکتریایی در اغلب فعالیتهای فیزیولوژیکی و متابولیکی و عملکرد روده نقش دارند.پروبیوتیکها یک مکمل خوراکی میکروبی زنده هستند که به دلیل ایجاد تعادل میکروبی و تعادل غذایی در روده انسان مفید می باشند(۳). گونه های باکتریایی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند باکتریهای اسید لاکتیک اند که بیشتر از جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر می باشند. بیفیدو باکتر ها باکتریهای گرم مثبت، بی هوازی، غیر متحرک، فاقد قدرت اسپورزایی، کاتالاز منفی هستند که محیط زندگی عادی آنها ناحیه کولون لوله گوارش انسان و حیوان است و تعداد آنها به جز هنگام کهولت سن که کاهش می یابد، ثابت است. ولی عواملی مثل رژیم غذایی، آنتی بیوتیکها و استرس هم می تواند باعث تغییر در تعداد آنها شود (۱۰). پروبیوتیکها مواد مختلفی تولید می کنند که هم برروی گرم مثبتها وهم روی گرم منفیها اثر می گذارند

و شامل اسیدچرب با زنجیره کوتاه مثل استات، لاکتات، سوکسینات، بوتیرات، H_2O_2 و ترکیبات باکتریوسین می باشد. پروبیوتیکها با اتصال به جایگاههای اتصال موجود در سلولهای پوششی، رقابت با باکتریهای پاتوژن برای دریافت مواد مغذی، کاهش pH ، تولید باکتریوسین و H_2O_2 از حضور این باکتریهای مضر در روده جلوگیری می کنند (۱۲).

فعالیتهای ضد سرطانی پروبیوتیکها از آزمایشات و مطالعات *in vitro* به دست می آید. در کارهای *in vivo* هم نشان داده شده که پروبیوتیکها در سرکوب زخمهای نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی در مدلهای موش نقش دارند. اثرات ضد سرطانی پروبیوتیکها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیر فعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتریهای پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژنها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می باشد(۱۴). با توجه به تأثیر میکروفلور روده در کاهش توسعه سرطان روده، تولید انواع جدیدی از فراورده ها که ضمن جلوگیری از ایجاد سرطان، باعث مهار سلولهای سرطانی شده و هیچ اثر مخربی بر روی سلولهای سالم نداشته باشد امری مهم به نظر می رسد. بدین جهت سعی بر این است که از پروبیوتیکها به این منظور استفاده شود. پروبیوتیکها از طریق تحریک سیستم ایمنی بدن، از بین بردن آنزیمهای مخرب و سرطان زا مثل اسید های صفراوی ثانویه و مواد موتاژنی که توسط باکتریهای روده ایجاد می شوند، می توانند در جلوگیری از سرطان کولون نقش مهمی را بازی کنند (۱۵).

مواد و روشها

کشت باکتری: *Bifidobacterium bifidum* از آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شد و مواد مورد استفاده برای کشت باکتری از شرکت Merck آلمان بود. باکتری توسط آزمایشات بیوشیمیایی شامل بررسی مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی Gram، تست کاتالاز و تست تخمیر قندها از نظر صحت جنس و گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه سوپرناتانت، *Bifidobacterium bifidum* با غلظت $۳/۱\times۱۰^{۳}$ cfu/ml در ۳۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع (DE Man ,Rogosa & MRS(Sharpe کشت داده شد و در شرایط بی هوازی (شرایط بی هوازی با جار بی هوازی تعبیه شد) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از هر ۲۴ ساعت (تا ۷۲ ساعت) pH محیط کشت و total count (به روش پورپلیت) محیط کشت حاوی *Bifidobacterium bifidum* جداگانه اندازه گیری شد. در هر زمان ۵۰ سی سی از محیط کشت حاوی*Bifidobacterium bifidum* در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ(ساخت Heraeus) شد و مایع رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر گذرانده شد. بدین ترتیب سوپرناتانت های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تهیه شد. هر کدام از سوپرناتانت ها به دو قسمت تقسیم شد بطوری که یکی از سوپرناتانت ها دارای pH نرمال (pH =۴) و یکی از آنها با استفاده از NaOH 1N خنثی شد (pH =۷). در نهایت ۶ سوپرناتانت به دست آمد و از همه آنها ذخیره فریزری تهیه شد.

کشت سلول: سلولهای سرطانی CacoII (Human colonic adenocarcinoma cells) از ذخیره سلولی آزمایشگاه پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه تهران و مواد مورد استفاده برای کشت سلول از شرکت GIBCO آمریکا بود. یک اپندورف ذخیره فریزری سلول Caco2 به داخل فلاسک حاوی محیط کشت سلولی (Roswell Park Memorial Institute) RPMI غنی شده با ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS)، ۲ mM L گلوتامین، Uml^{-1} ۱۰۰ پنی سیلین و $۱۰۰mgml^{-1}$ استرپتومایسین کشت داده شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. بعد از ۷۲ ساعت برای ادامه رشد، سلولها پاساژ(Subculture) داده شدند. برای این کار از تریپسین 1X برای جداسازی سلولها از دیواره فلاسک استفاده کرده و بعد از جداسازی

با محیط RPMI رقیق شد. سوسپانسیون حاصل در rpm ۱۵۰۰۰ دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در مقداری RPMI تعلیق شده و تعداد سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار در ۱ میلی لیتر شمارش شد.

کشت سلول در میکروپلیت ۹۶ خانه ای و بررسی اثر سوپرناتانت باکتری روی کشت سلولی CacoII: در ۳ میکروپلیت ۹۶ خانه ای، در داخل هر خانه از میکروپلیت ها ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت سلولی که حاوی ۸۰۰۰ سلول بود ریخته شد. در یکی از میکروپلیت ها از هر ۶ سوپرناتانت به دست آمده ۱۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر در دومی ۲۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر و درسومی ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر و از هر کدام ۳ تکرار به خانه ها اضافه شد. و در یک ردیف از هر میکروپلیت که شاهد مثبت در نظر گرفته شد سلولهایCacoII با همان میزان ذکر شده به همراه محیط کشت RPMI تلقیح شدند و به عنوان شاهد منفی به یک ردیف از میکروپلیت ها محیط کشت RPMI تلقیح شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 میکروپلیت ها با کریستال ویوله رنگ آمیزی و تثبیت شدند و سلولهای مرده با شستشو حذف شدند. میزان جذب نوری سلولهای رنگ شده CacoII در طول موج ۵۷۰ nm به وسیله دستگاه Elisa reader(anthos 2020) اندازه گیری شد و سپس با استفاده از محاسبات ریاضی و جذب نوری سلولهای شاهد در صد سلولهای زنده محاسبه شد.

آنالیز آماری: اعداد به دست آمده از دستگاه Elisa reader با استفاده از نرم افزار آماری ANOVA تجزیه تحلیل شد و اختلاف معنی دار(۰/۰۰۰۱ > ارزش P)، بین سه فاکتور زمان، غلظت و pH به دست آمد.

نتایج

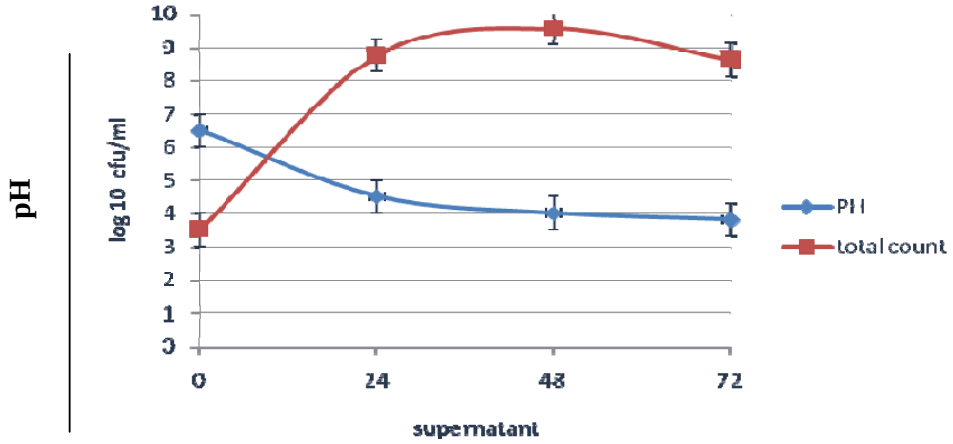
در شناسایی باکتری از نظر صحت جنس و گونه، کلنیهای باکتری، گرد، محدب، سفید و پر و بعد ار رنگ آمیزی Gram در زیر میکروسکوپ باکتریهای گرم مثبت، به صورت میله ای، میله خمیدهٔ، میله تجمعی یا میله ای Y شکل و به رنگ آبی دیده شد. تست کاتالاز منفی بود و در نهایت نتایج تست تخمیر قندها و مقایسه با جدول برگی برابر با *Bifidobacterium bifidum* بود (۱).

در بررسی کشت باکتری *Bifidobacterium bifidum* مشخص شد که با افزایش زمان، کاهش pH روی می دهد که خود می تواند عاملی در کاهش رشد باکتری باشد به طوری که در زمان ۰، pH ۶/۵ و تعداد باکتریهای زنده $۳/۱\times۱۰^{۳}$ ، در ۲۴ ساعت pH به حدود ۴/۵ رسیده و تعداد باکتریهای زنده $۵/۷\times۱۰^{۸}$، در ۴۸ ساعت pH به ۴ رسیده و تعداد باکتریها به $۳/۸\times۱۰^{۹}$ ودر ۷۲ ساعت pH به زیر ۴ رسید و عملاً هیچ رشدی از ۴۸ تا ۷۲ ساعت صورت نگرفت و حتی برخی از باکتریها هم از بین رفته و تعداد باقیمانده به$۴/۱\times۱۰^{۸}$ رسیده است (شکل ۱).

در بررسی اثر پروبیوتیکی سوپرناتانت ها ی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت *Bifidobacterium bifidum* با دو pH ۴ و ۷ در سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر روی سلولهای سرطانی CacoII اعداد به دست آمده پس از بررسی در نرم افزار آماری ANOVA تجزیه و تحلیل شد و انحراف معیار ۰/۷۵ و R^2 نیز ۰/۹۹۵۰ به دست آمد (جدول۱). نتایج به دست آمده نشان داد که این سوپرناتانت ها توانایی مهار رشد سلولهای سرطانی را داشتند .

اختلافات معنادار بین سوپرناتانت های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعته و بین غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر بود به طوری که سوپرناتانت ۷۲ ساعته نسبت به ۴۸ ساعته و آن هم نسبت به ۲۴ ساعته اثر مهاری بیشتری داشت.

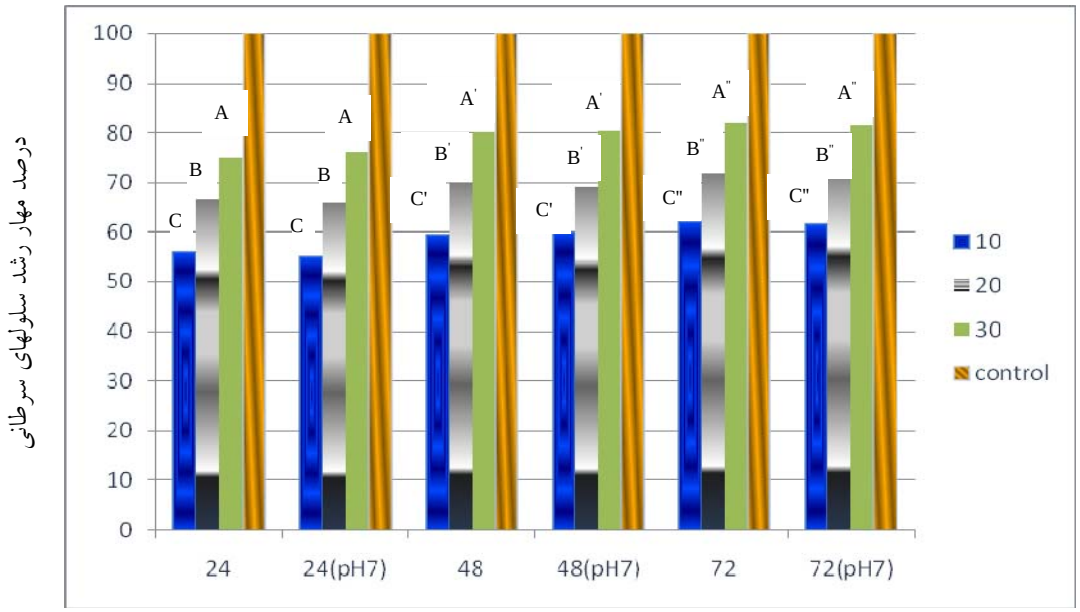
غلظت ۱۰۰ میکرولیتری/میلی لیتر، سوپرناتانت ۲۴ ساعته ۵۵ درصد و سوپرناتانت ۴۸ ساعته حدود ۵۹ درصد و سوپرناتانت ۷۲ ساعته تا ۶۱ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کرد. در غلظت ۲۰۰ میکرولیتری/میلی لیتر، سوپرناتانت ۲۴ ساعته حدود ۶۶ درصد، سوپرناتانت ۴۸ ساعت حدود ۷۰ در صد و سوپرناتانت ۷۲ ساعته تا ۷۲ درصد از سلولهای سرطانی CacoII را توانست مهار کند. در غلظت ۳۰۰ میکرولیتری/میلی لیتر، سوپرناتانت ۲۴ ساعته ۷۶ درصد، سوپرناتانت ۴۸ ساعته حدود ۷۹ درصد و سوپرناتانت ۷۲ ساعته توانست تا ۸۲ درصد رشد سلولهای سرطانی CacoII را مهار کند. در بین غلظتهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر ،غلظت ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بیشتر از ۲۰۰ میکرولیتر /میلی لیتر و آن هم بیشتر از ۱۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بر روی رشد سلولهای سرطانی اثر کرد به طوری که بیشترین اثر مربوط به غلظت ۳۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر بود که ۸۲ درصد رشد سلولهای سرطانی را مهار کرد(شکل ۲) ولی بین pH =۴ و pH =۷ اختلاف معنی داری وجود نداشت و سوپرناتانت اسیدی اثر مهاری مشابه با سوپرناتانت خنثی داشت.



شکل ۱ - تغییرات pH و total count در مدت زمان ۷۲ ساعت از کشت باکتری *Bifidobacterium bifidum* در محیط آبگوشت MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (اعداد گزارش شده میانگین ۳ نمونه اندازه گیری شده است).

جدول ۱ - محاسبات آماری در تعیین اختلاف معنی دار بین سه فاکتور زمان ، غلظت و pH به وسیله نرم افزار آماری ANOVA

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۴۰۴۴/۶۵	۱۷	۲۳۷/۹۲	۴۲۴/۷۲	< ۰/۰۰۰۱
A .غلظت	۳۶۸۱/۳۷	۲	۱۸۴۰/۶۹	۳۲۸۵/۸۵	< ۰/۰۰۰۱
B.pH	۰/۳۰	۱	۰/۳۰	۰/۵۳	۰/۴۷۱۸
C . زمان	۳۵۲/۹۵	۲	۱۷۶/۴۸	۳۱۵۱/۰۳	< ۰/۰۰۰۱
AB	۱/۵۹	۲	۰/۸۰	۱/۴۲	۰/۲۵۴۶
AC	۳/۹۱	۴	۰/۹۸	۱/۷۴	۰/۱۶۱۸
BC	۹/۲۵۹E-۰۰۳	۲	۴/۶۳۵ E- ۰۰۳	۸/۲۶۴E-۰۰۳	۰/۹۹۱۸
ABC	۴/۵۲	۴	۱/۱۳	۲/۰۲	۰/۱۱۲۹
خطای خالص	۲۰/۱۷	۳۶	۰/۵۶		
مجموع	۴۰۶۴/۸۱	۵۳			



شکل۲- اثر سوپرناتانت های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعته بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و غلظتهای متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتری/میلی لیتر روی رشد سلولهای سرطانی CacoII($p<0.0001$ معنا دار در نظر گرفته شده است و C",C',C,B",B',B ,A",A',A با هم تفاوت معنادار دارند)

بحث

در این تحقیق اثر پروبیوتیکی *Bifidobacterium bifidum* روی سلولهای سرطانی CacoII مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که سوپرناتانت *Bifidobacterium bifidum* توانایی مهار رشد سلولهای سرطانی کولون را دارد. مطالعات اپیدمیولوژی انجام شده در فنلاند توسط Malhotra در سال ۱۹۷۷ بیان کرد که علی رغم مصرف چربی بالا، سرطان کولون کمتر از کشورهای دیگر وجود دارد و آن به دلیل مصرف زیاد شیر، ماست و دیگر فراورده های لبنی است (۱۱). در مطالعات in vitro در سال ۱۹۹۵ توسط Laurent Baricault ، تأثیر شیر تخمیر شده با۴ نوع باکتری مختلف پروبیوتیکی به طور جداگانه روی سلولهای سرطانی HT29 (سلولهای سرطانی رکتوم) بررسی شد و مشاهده شد که *Bifidobacterium* و *L. helaventicus* بیشترین تأثیر را روی مهار رشد سلولهای سرطانی داشته و تا ۵۰ درصد رشد سلولهای سرطانی را مهار کردند. همچنین نشان داده شد که دی پپتیدیل پپتیداز، یک مارکر حساس و مؤثر در تمایز HT29 نقش دارد و ۳ آنزیم دیگر مؤثر سوکراز،N آمینوپپتیداز و آلکالین فسفاتاز به طور محسوسی افزایش پیدا کرد. او پیشنهاد کرد که تولیدات این باکتریها می تواند روی رشد و تمایز سلولها تأثیر داشته باشد (۷). طی مطالعه ای توسط Biffi در سال ۱۹۹۷ روی اثر مهاری ۵ گونه مختلف از باکتریهای اسید لاکتیک روی سلولهای سرطانی سینه (MCF7) ، مشاهده شد که هر ۵ گونه باکتری *Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium animalis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei* روی رشد سلولهای سرطانی اثر مهاری داشته و بیشترین اثر مربوط به *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium infantis* بود که تا ۸۵ در صد رشد سلولهای سرطانی را مهار کرد. همچنین نشان داد که وجود خود باکتریها به طور زنده تأثیری نداشته و دلیل این

عمل را به تولید ترکیبات ضد توموری و ضد توسعه سرطانی توسط این باکتریها نسبت داد (۲). طی بررسی در سال ۲۰۰۸ توسط Yunakim ، سوپرناتانت *B. spmo212* ، تکثیر سلولهای سرطانی روده انسان HT-29,SW480,CacoII را مهار کرد (۱۸). در سال ۲۰۰۹ Elise L. Ma نشان داد که ترکیبات تولیدی توسط *Bacillus polyfermenticus* رشد سلولهای سرطانی HT29 و سلولهای سرطانی CacoII را به ترتیب ۵۶-۳۵ درصد و ۹۵ تا ۹۹ درصد مهار کرد. او نشان داد که افزایش بیان پروتئینهای ErbB2 و ErbB3 در سلولهای سرطانی کولون تحت اثر متابولیتهای این باکتری کاهش یافتند و نتیجه گرفت که متابولیتهای باکتری نسخه برداری از این فاکتور ها را کاهش می دهند (۵). همچنین در این تحقیق نشان داده شد که خنثی کردن سوپرناتانت تفاوت معناداری در اثر مهاری آن نداشت. می توان گفت که حالت اسیدی سوپرناتانت عامل اصلی مهار رشد سلولی نبوده است و احتمالاً ترکیبات غیر اسیدی در این مهار نقش داشتند. در طی مطالعه ای ، Zoran D.etal در سال ۱۹۹۷ نشان داد که بوتیرات تولیدشده توسط باکتریهای اسید لاکتیک در کولون نقش ضد کارسینوژنزی داشته و می تواند آپوپتوز و تمایز سلولهای کولونی را تنظیم کند (۱۹). در سال ۲۰۰۸، توسط Do Kyony Lee مهار رشد سلولهای توموری به وسیله بوتانول استخراجی از *B. adolescentis* را نشان داد و در این مطالعه غلظت ۲۰ میکرولیتری از بوتانول تا ۷۰ درصد توانست سلولهای سرطانی CacoII را از بین ببرد (۸). به طور کلی می توان گفت مکانیسمهای مؤثر در مهار رشد سلولهای سرطانی CacoII توسط ترکیبات *Bifidobacterium bifidum* کاملاً مشخص نیست ولی با توجه به مطالعاتی که قبلاً در موارد مشابه انجام شده می توان گفت که این باکتریها ترکیبات ضد توموری و ضد سرطانی تولید می کنند که می توانند در رشد و تمایز سلولهای سرطانی نقش داشته و از رشد آنها جلوگیری کند . با توجه به نتایج به دست آمده مشاهده شد که سوپرناتانت ۷۲ بیشترین اثر را داشت که این می تواند به دلیل مقدار بیشتر متابولیتهای تولید شده در سوپرناتانت باشد (۴). در سال ۲۰۰۶ ، Vander Meulen بیان کرد که با افزایش در تعداد باکتریها مقدار مواد تولیدی آنها نیز افزایش می یابد و در فاز ثابت مقدار این متابولیتها ثابت است (۱۶). برخی از قطعات سلولی می تواند اثر ضد توموری داشته باشد. در سال ۱۹۹۵ ، Sekine اثر ضد توموری گلیکوپروتئین های جدا شده از *B. infantis* را مشاهده کرد (۱۳). همچنین You در سال ۲۰۰۴ نشان داد که سلول و عصاره سیتوپلاسمی *BGN4* *Bifidobacterium bifidum* ایزوله شده از مدفوع انسانی می تواند اثر مهاری روی سلولهای سرطانی داشته باشد و همین طور قطعات پلی ساکاریدی جدا شده از *BGN4* *Bifidobacterium bifidum* روی رشد سلولهای سرطانی در in vitro نقش مهاری داشت (۱۷).

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاری وابسته به غلظت بود و غلظت ۳۰ میکرولیتری تا ۸۰ در صد از رشد سلولهای توموری را مهار کرد . تأثیر غلظت تولیدات باکتری تاکنون گزارش نشده و تنها در سال ۲۰۰۸، Do Kyony Lee منع رشد سلولهای توموری را به وسیله بوتانول استخراجی از *B. adolescentis* نشان داد. در این مطالعه نیز غلظت ۲۰۰ میکرولیتر/میلی لیتر از بوتانول توانست ۷۰ درصد سلولهای سرطانی CacoII را از بین ببرد (۸).

منابع

1. Ahn JB: Isolation and characterization of *Bifidobacterium* producing exopolysaccharide. *Food Eng Prog* 2005, 9:291-296.
2. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L & Di Fronzo G . (1997) Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutrition and Cancer*; 28:93–99.

3. Commane D, Roisin H,etal.(2005).Review,The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotic. *Mutation Research* ,591:276-289

4. Desjardins M-L,Roy D (1990) Uncoupling of Growth and Acids Production in *Bifidobacterium* ssp. *J Dairy Sci*;73:1478-1484

5. Elise L. Ma, Yoon Jeong Choi, Jinyoung Choi, Charalabos Pothoulakis, Sang Hoon Rhee and Eunok Im. (2009) The anticancer effect of probiotic Bacillus polyfermenticuson human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. Int. J. *Cancer*; 000, 000–000

6. Kiss.I,Sander.J. (2000).Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1.2E1 and glutathione-s-transferase enzyme,*Anticancer Res*; 20: 519-522

7. Laurent B, Gerard D , Jean-Jacques H, Christine B, Catherine S, Germain T. (1995) Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation J *Carcinogenesis.* ;16(2):245-52

8. Lee D.K.Seok J,. (2008)Anti-proliferative effect of *Bifidobacterium adolescentis SPM212* extract on human colon cancer cells line.*BMC Cance*r; Volume 8:310

9. Lee WK,Lee SM,(2000),Inhibition effects of lactic acid bacteria (LAB)on the Azoxymethance-induce colonic preneoplastic lesion. J microbial ,38:169-175

10. Lievin.V, Peiffer.I, etal.(2000).Bifidobacterium strans from resident infant human gastriointestinal microflora exert antimicrobial activity.Gut,47(5):646-652

11. Malhotra SL.(1977). Dietary factors in a study of colon cancer from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk, and fermented milk products and vegetable fibre. *Medical Hypotheses*; 3, 122

12. Marie C, Bourtron R.(2005).Probiotic and colorectal cancer. *Nutrition Clinique et Metabolism*,volume 21:85-88

13. Sekine,K.J.ohta.M.Onishi,T.Tatsuki,Y.Shimokawa,T.Toida.T.Kawashima, Y.Hashimoto , (1995). Analysis of antitumor properties of effector cell stimulated with cell wall preparation (WPG)(B. infantic.Biol.Pharm.Bull.18:148-153

14. Shira D , Sherwood L. G. (2006).Probiotics:their role in the treatment and prevention of disease. J *Expert Review Of Anti infective Therapy*;vol.4,(2)261-275

15. Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS,(1997) *Bifidobacterium longum***,** a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Cacinogenesis, 18**:**833-841

16. Van der Meulen R , Adriany T, Verbrugghe K , Luc De Vuyst.(2006). Kinetic Analysis of Bifidobacterial Metabolism Reveals a Minor Rolefor Succinic Acid in the Regeneration of NAD_ through Its Growth-Associated Production APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Vol. 72, No. 8 p. 5204–5210

17. You HJ, Oh DK, Ji GE (2004).Anticancerogenic effect of a novel chiroinostol-contaning polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum BGN4*.FEMS Microbial. Lett.,240:131-136

18. Yunakim, lee D,etal.(2008)Inhibition of proliferation in colon cancer lines and harmful enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentisSPM212*.J *Archives of Pharmacal Research*;volum31:468-473

19. Zoran.D, Barhoumi.R, .RBurghardt, R. Chapkin, J. Lupton. (1997)Diet and carcinogen alter luminal butyrate concentrations and intracellular pH in isolated rat colonocytes, *Nut. Cancer*;27:222–230.

Study of probiotic effect of *Bifidobacterium bifidum* on CacoII cancer cell line

Mahmoudi Aslzadeh H.[1], Fazeli M.[2], Eaidi A.[1], Samadi N.[2], Jamalifar H.[2] and Parsaseresht L.[1]

[1] Biology Dept., Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Drug and Food Control Dept., Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University, Medical Science, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Probiotics are live microbial supplements with a wide range beneficial in human life.Effect of probiotic microorganisms on human cancer is a controversial issue. In this work the inhibitory effect of the supernatant of an autochthonous isolate of *bifidobacterium bifidum* on the CacoII cells of human colonic carcinoma was investigated. Different concentration of 100,200, and 300 µl/ml of the supernatant of the probiotic bacteria harvested at 24,48 and 72 hours of bifidobacterial growth in MRS media were applied in to the 96 well microplates each containing 8000 cells of CacoII after neutralization of the pH with 1N NaOH. The percentage of cancer cells inhibition observed ranged from 55% to 82% which obtained from 100 µl/ml (24h)and 300 µl (72h) supernatants. The inhibitory effect of the probiotic bacteria on human cancer cells seems to be concentrated dependent and not affected by neutralization.

Keywords: Probiotic, *Bifidobacterium bifidum*, colon cancer, CacoII cells