

In vitro Apoptosis Induction in Prostate Cancer Cells (PC-3) using *Bacillus licheniformis* Supernatant

Ahmadreza Shahniani¹, Zahra Bamzadeh^{2*} , Fahimeh Mahmoudnia³, Leila Rouhi⁴

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University Shahrekord, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science, Farhangian University, Tehran, Iran
4. Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

 10.30699/ijmm.14.5.618



ABSTRACT

Background: Cancer is one of the most common causes of death in humans. Therefore, there is a need for new cytotoxic compounds from natural sources such as native bacteria. The current study aimed at investigating the cytotoxic effects of compounds obtained from gram-positive terricolous bacteria on the apoptosis of cells in prostate cancer (PC-3).

Materials & Methods: A total of 70 soil samples were obtained from various locations in Chaharmahal & Bakhtiari province (Iran, Spring 2019) and were cultured on Nutrient agar and Trypticase soy agar. After identification of gram-positive species, the best species in regards to microbial activity was identified using 16S rRNA gene sequencing. Then, in order to investigate the cytotoxic activity, PC-3 cell line was treated in different concentrations of the supernatant from the selected species for different durations while viability and apoptosis were determined using MTS and Annexin tests.

Results: A total of 467 gram-positive bacteria were isolated from 70 soil samples, among which 9 species had antimicrobial capabilities. Among these selected species, *Bacillus licheniformis* which had the best antimicrobial compounds, was selected for further investigation of its viability and apoptosis effects on PC-3 cell line. The MTS with incubation time of 24, 48 and 72 hours of the treated cells indicated that the viability is dependent on the dosage and an increase in the concentration can result in significant decrease in the viability compared to the control group ($P < 0.05$). The amount of apoptosis induction in PC-3 cells also significantly increased with increase in supernatant concentration dependent on dosage and time ($P < 0.05$). The largest effect was observed at supernatant concentration of 20 mg/mL at 72 hours after cell treatment.

Conclusion: Using compounds obtained from gram positive terricolous bacteria can help in treatment of prostate cancer cells.

Keywords: Soil, *Bacillus licheniformis*, Prostate Cancer, MTS, Apoptosis

Received: 2020/08/19;

Accepted: 2020/09/28;

Published Online: 2020/10/20

Corresponding Information:

Zahra Bamzadeh, Ph.D of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Email: Bamzadehz@yahoo.com



Copyright © 2020. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Shahniani A, Bamzadeh Z, Mahmoudnia F, Rouhi L. In vitro Apoptosis Induction in Prostate Cancer Cells (PC-3) using *Bacillus licheniformis* Supernatant. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (6) :618-642

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Today, cancer is one of the most important health challenges all over the world and 25% of death cases in the United States are due to cancer. Half of all the cancer cases occur in Asian countries which make 60% of the world

population. It has been estimated that the cancer cases will increase from 6.1 million in 2008 to 10.6 million in 2030, which is due to the significant growth of the world's oldest population, and changes in the lifestyle and economic

changes in the society (1). In the developed countries, the prostate cancer is the second most common cancer (after skin cancer) and the second deadliest cancer (after lung cancer) in men. So that, one in six men develops prostate cancer. The epidemiological studies have also shown that hereditary factors play a role in the incidence of 10% of these cases. The highest and the lowest prevalence of prostate cancer were found in Africa and Asia, respectively (2). On the other hand, the first gene locus known to be associated with the prostate cancer was the Hereditary Prostate Cancer locus-1 (HPCL). Several other candidate genes have been identified since this discovery, although most of them are less important due to their low frequency. Most of the prostate tumors are adenocarcinomas. The hereditary history of prostate cancer is an important factor in the development of this cancer. The hereditary factors are involved in a small percentage of prostate cancers and are usually associated with the early onset. In men, increased androgen levels are associated with an increased risk of prostate cancer. The androgen receptor gene plays an important role in the development and progression of prostate cancer. Also, AR, HSD3B, 2HSD3B1, SRD5A2, and CYP17 genes have a special role in the cell proliferation in androgen metabolism in prostate.

Some polymorphisms in these genes are associated with an increased risk of prostate cancer. Mutations in androgen receptor are found in almost all cases of prostate cancer, and treatment strategies for this cancer emphasize on the reducing or eliminating testosterone binding to the androgen receptor. The epigenetic changes, especially DNA hypermethylation in the promoter regions, play an important role in reducing the expression of genes important for the care and prevention of prostate cancer. A number of molecular and genetic changes have been observed in prostate cancer. These factors play a role in the onset and progression of prostate cancer. Metastasis-inhibiting genes are also known in prostate cancer. The hypermethylation of promoter regions of some genes involved in apoptosis is also known in cancer.

Prostate cancer, in fact, is the presence of cancer cells in this organ, for the increased androgen level of the adrenal glands, which cause obstruction in the urinary tract (3, 4). The main alarming signs of the prostate cancer include: frequent or difficult urination, poor urine flow, inability to urinate, urinary incontinence, intermittent and poor urine flow, blood in the urine, painful ejaculation, persistent low back pain and sexual impotence (5). Regardless of the gender or racial origin, the strongest known risk factor in this case is a family history of the disease. Prostate cancer is the most common cancer diagnosed in American men. It is more likely for a man who does not smoke, to develop about 17% prostate cancer more than other cancers (6).

One of the diagnostic and screening methods for the prostate cancer is the prostate gland finger examination through the rectum.

Rapid diagnosis of the prostate cancer is mediated by measuring the prostate-specific antibody (PSA) using screening tests. The level of this antibody is higher in the patients with prostate cancer. In some cases, an infection or benign enlargement of the prostate gland can cause an increase in the PSA in the blood. Therefore, combining the anal examination with PSA level in the blood is a more accurate way to diagnose prostate cancer. In the next stages, other examinations such as MRI, ultrasound, computed tomography and gland sampling are performed (7).

Conventional treatment options for the prostate cancer include surgery (complete removal of the prostate gland or prostatectomy) (8), cold surgery or cold therapy (9), chemotherapy, radiotherapy, and gene therapy (10). There are various mechanisms by which these treatments are able to control various tumor cells, including induction of apoptosis, increased mitochondrial membrane permeability, and blocking transduction signals (processes that occur in the metabolic pathway) through inhibition of the key enzymes, cytomorphological changes due to impaired cell differentiation, and tumor-induced angiogenesis. Antitumor compounds produced by *Streptomyces* occasionally act by disrupting double-stranded DNA, leading to detrimental effects on the rapid cell proliferation by inhibiting DNA-dependent RNA polymerase activity (11).

Finally, despite the fact that there are different ways to treat cancer, cancer is still a common and public concern. Chemotherapy is one of the most effective ways to control cancer, but it requires a constant supply of the new antitumor compounds. Cancer treatment is still a major issue for the physicians and the pharmaceutical industry. More than 60% of the chemotherapeutic agents used today to treat cancer are compounds that have been identified from the soil microorganisms or compounds synthesized or derived from them with the modified properties (12). Because soil is the home to a variety of living organisms, including bacteria, fungi, protozoa, nematodes, insects, and many other living organisms. The bacterial population can reach 10^8 to 10^9 cells per gram of dry soil weight at soil surfaces. Soil bacteria are very diverse and can be aerobic, anaerobic or optional anaerobic. In addition, they can be heterotrophic or autotrophic in terms of nutrition (2).

Studies have shown that the soil and rhizosphere contain thousands of unique bacterial species per gram of soil. However, today only a very small part of these bacteria that are capable of producing secondary biological metabolites have been studied.

Studies have shown that strains of bacteria are able to produce a wide range of secondary metabolites encoded by gene clusters that are not expressed in vitro. Secondary

metabolites are not directly involved in the growth, development, or proliferation of the bacteria, but these metabolites may play ecological roles in the interaction of these bacteria with other organisms (13). In other words, many microbial metabolites are essential drugs in the treatment of cancer. Their therapeutic application began from 1940 with the discovery of actinomycin, and since then many new compounds with anti-cancer properties have been identified and isolated from natural sources (12).

Finally, due to the increasing cancer prevalence, which is one of the most important and common causes of death in human, there is a need to discover new compounds and create independency in the production of anti-cancer metabolites and being independent from foreign countries. On the other hand, few studies have been done on the effect of microbial production metabolites on cancer cells. Also, the society needs to identify new biologically active compounds produced by endemic bacteria. In this study, the anti-cancer effects of metabolites extracted from *Bacillus licheniformis* isolated from the soil of Chaharmahal and Bakhtiari province was investigated against prostate cancer cell line (PC-3).

Materials and Methods

The present study is a cross-sectional descriptive study that the inclusion criterion is *Bacillus licheniformis* metabolites production and the exclusion criterion is

the effect of produced metabolites on the apoptosis induction in the prostate cancer cells (PC-3).

Isolation and Identification of Gram-positive Bacteria from Soil Samples

During this study, 70 soil samples were collected from different regions of Chaharmahal and Bakhtiari province in the spring of 2019 from the depth of 10 to 15 cm next to the plant roots and transferred to the laboratory to isolate and identify the gram-positive bacteria (14). To identify their phenotype, following culture and purification of bacteria, the macroscopic and microscopic characteristics of each isolate were examined (15, 16). After initial identification, the best isolate in terms of antimicrobial compounds production with a wider range of effects was identified using molecular identification method.

Molecular Identification of Gram-positive Bacteria Producing Antimicrobial Compounds

The 16S rRNA gene sequence was used for the genotypic identification. First, DNA extraction was performed using DNA extraction kit (CinnaGen, Iran). Then, to ensure the purity of DNA, the light absorption of the sample was measured at 260/280 nm wavelength. If the DNA sample is pure, the ratio should be above 1.8, otherwise, the DNA is considered impure. Forward and reverse primers for 16S rRNA gene were synthesized by CinnaGen Company (Table 1).

Table 1. Primers sequences for 16s rRNA gene (17).

Primer	Sequence (5'→3')
1000F16	CAACGAGCGCAACCC
1429R	GGTTACCTTGTTACGACT

To prepare a master mix with a volume of 25 µL, sterile distilled water (18 µL) was mixed with 10X PCR buffer with (2.5 µL), 0.75 µL MgCl₂, 0.5 µL dNTP, 1 µL forward and reverse primers (10 pmol/µL), 0.25 µL polymerase enzyme and 1 µL of template DNA. Finally, the PCR program was performed by thermal cycling apparatus (Eppendorf, Germany). To start the polymerization process, the thermal cycling machine was set at 95°C for 180 sec, followed by 35 cycles of 95°C for 60 sec, 56°C for 45 sec and 72°C for 60 sec. Final elongation was performed at 72°C for 300 sec (17). To confirm the amplification of 16S rRNA gene, the PCR product was electrophoresed on 1% agarose gel. The PCR product was sent to Macrogen Co., Korea for sequencing. The obtained sequence was evaluated using BLAST software of NCBI (17).

Bacillus licheniformis Culture

In order to isolate the products, *Bacillus licheniformis* was cultured in TSB (Trypticase Soy Broth) medium for

48 hr, and then centrifuged at 12000 g for 10 min. The cells were separated from supernatant. The supernatant was used to evaluate the cytotoxic activity. For this purpose, the supernatant was lyophilized for 7 hr and then dried. The samples were stored at -20°C until use (14).

Cytotoxic Effects of *Bacillus licheniformis* Supernatant on PC-3 Cancer Cell

The PC-3 prostate cancer cell line that is used for the prostate cancer research and drug production was obtained from the Pasteur Institute of Iran. The PC-3 cell line was derived in 1979 from grade 4 bone metastasis of prostate cancer from a 62-year-old Caucasian man. After transferring the flask to the lab, the cell media was removed and fresh medium (RPMI + FBS10% + Pen / Strep1%) (Sigma Company) was added and incubated at 37°C, 5% CO₂ and 95% O₂ atmosphere.

To investigate the effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on the prostate cancer cells apoptosis,

the cells were exposed to different concentrations. The experimental groups included: Group I: Cells were exposed to 5 mg/ml concentration of *Bacillus licheniformis* supernatant. Group II: Cells were exposed to 10 mg/ml concentration of *Bacillus licheniformis* supernatant. Group III: Cells were exposed to 15 mg/ml concentration of *Bacillus licheniformis* supernatant. Group IV: Cells were exposed to 20 mg/ml concentration of *Bacillus licheniformis* supernatant. Control group: Cells were exposed to RPMI1640 culture medium.

The MTS kit (Promega) is a quantitative and colorimetric assay. The MTS is reduced by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase in living cells. Briefly, the cells were cultured into 96-well plate (5×10^3 cell/well). After 24 hr and cell confluency, the supernatant was replaced with new media containing different concentrations of metabolite (5, 10, 15 and 20 mg/mL for groups I, II, III and IV, respectively) and the cells were incubated for 24, 48 and 72 hr. Untreated cells were considered as control. After the incubation times, 20 μ L of MTS solution was added to each well and incubated for 4 hr. The intensity of the color was determined by ELISA reader at 492 nm wavelength. All the experiments were repeated three times and the data were expressed as mean \pm SD (18).

Apoptosis Assay

The apoptosis induction was assessed using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, product number 556547 (BD Pharmingen, USA). The concentrations of 5, 10, 15 and 20 mg/ml of the metabolite at intervals of 24, 48 and 72 hr were used to evaluate the apoptosis. The cells were trypsinized, harvested and centrifuged after washing with PBS (Gibco, USA). The Annexin-V dye bound to FITC and

Propidium iodide (PI) were added (5 μ L) and incubated for 15 min at room temperature in dark and evaluated by flow cytometry (FACSCalibur, USA) (18).

Statistical Analysis

Data statistical analysis was performed by SPSS software using t-test and ANOVA parametric test. To determine the significant difference between the treated groups and the control group, the $P < 0.05$ was calculated as a significant difference and the results were shown as the mean \pm SD.

Results

After collecting and preparing 70 soil samples from different regions of Chaharmahal and Bakhtiari province, the screening steps were performed on each sample separately. From the culture of soil samples on the nutrient agar and tryptide soy agar and purification of the obtained colonies, 467 gram-positive bacterial colonies were isolated. Among them, 9 gram-positive isolates with the ability to produce antimicrobial metabolites were identified. The best isolate in terms of antimicrobial compounds production with a wider range of effects was identified by molecular identification technique. The 16S rRNA alignment results showed that *Bacillus licheniformis* is the best strain in terms of antimicrobial compounds production (Figure 1). Finally, the selected strain was used to evaluate the cytotoxic effects.

Cytotoxic Results of *Bacillus licheniformis* Supernatant on PC-3 Cell Line

The microscopic observations showed the morphological changes and a decrease in the cell number in the treated groups in a concentration- and time-dependent manner (Figures 2 and 3).

Bacillus licheniformis gene for 16S rRNA, partial sequence

Sequence ID: [dbj|AB275356.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AB275356.1) Length: 1501

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
555 bits(300)	2e-154	348/371(94%)	4/371(1%)	Plus/Plus

Query 16 TTGCGGC-CTCTAAGGTGACTGCCGGTGA-TAACCGGAGGAAGgggggATGACGTCAAA 73

|||||

Sbjct 1126 TTG-GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAA 1184

Query 74 TCATCCTGCCCCCTTATGACCTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGGCATAACAAAGGGCAA 133

|||||

Sbjct 1185 TCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAG 1244

Query 134 CGAACCCCCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAATTCGGATCGCAATCTGCA 193

```

||||| ||| ||||||||||||||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1245 CGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA 1304

Query 194 ACTCCACTGCCTGAAGCTGGAATCCCTAGTAATCCCGGATCAACATGCCGCGGTGAATAC 253
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 1305 ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC 1364

Query 254 CTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCG 313
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1365 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCG 1424

Query 314 GTGAGGTAACCTTTTGAACCAGCCGCCCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT 373
||||||||| ||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct 1425 GTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT 1484

Query 374 A-CATGTAACC 383
| || |||||
Sbjct 1485 AACAGGTAACC 1495

```

Figure 1. The 16S rRNA gene alignment analysis of the selected strain

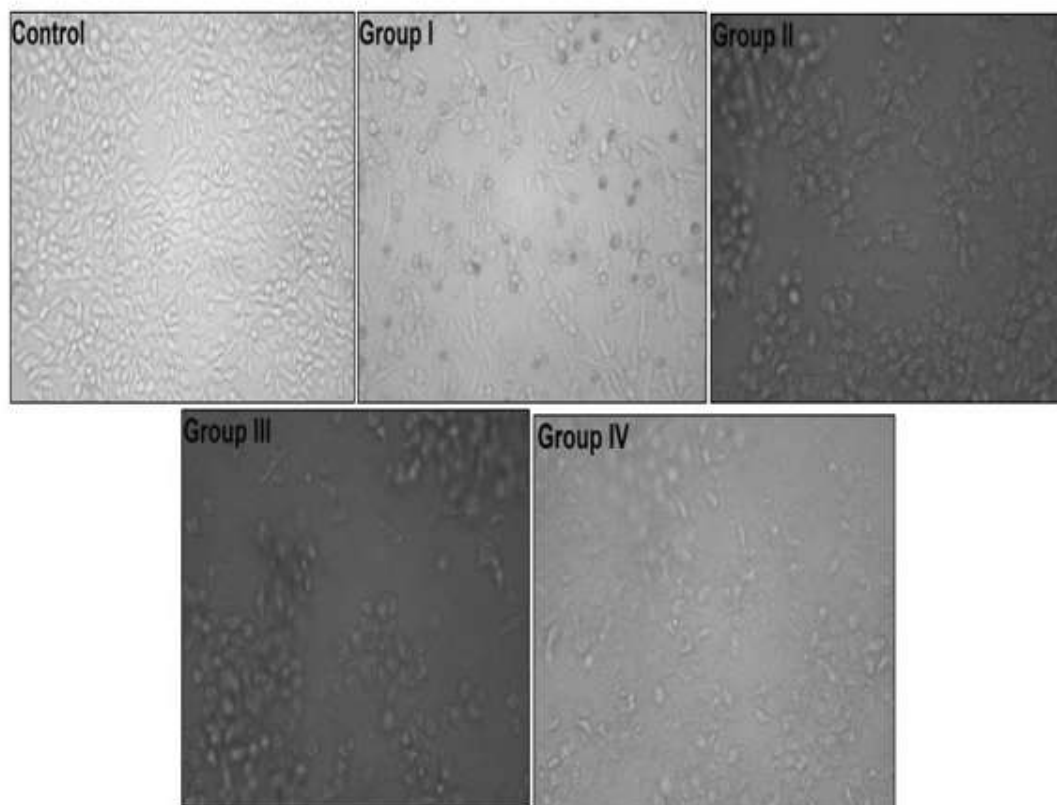


Figure 2. The effects of different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cell line during 48 hr incubation.

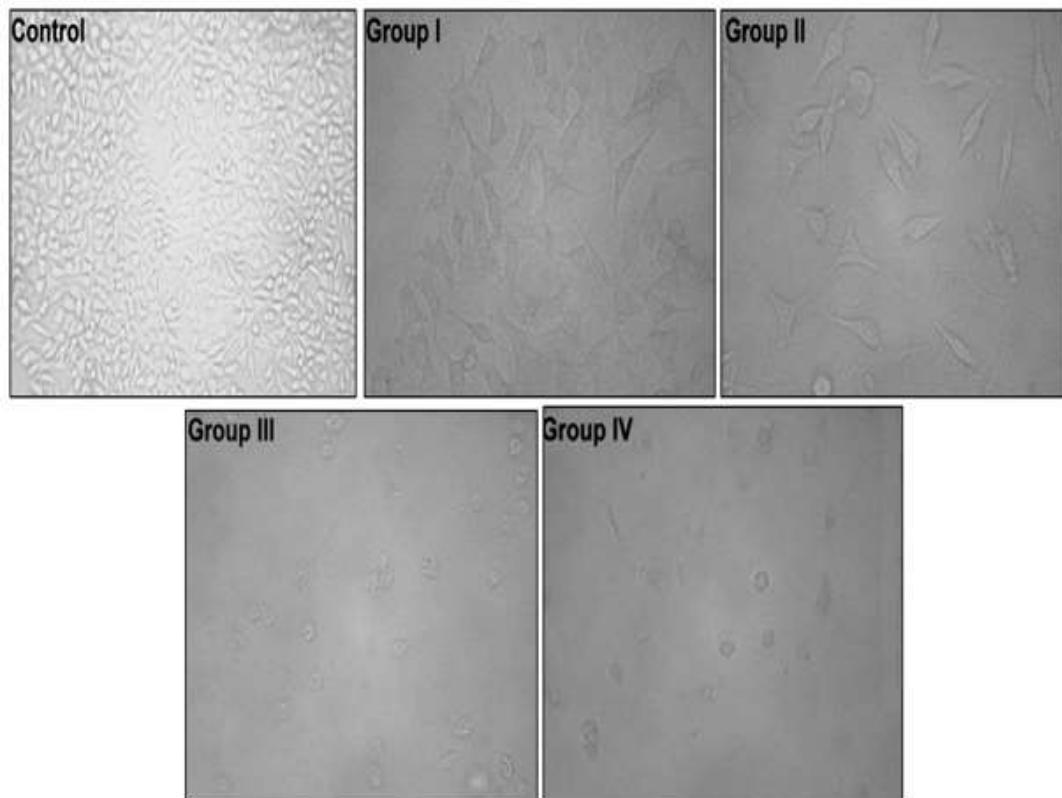


Figure 3. The effects of different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cell line during 72 hr incubation.

The effect of different concentrations of supernatant in PC-3 cell survival was measured at 24, 48, and 72 hr after treatment. In 24 hr treatment, PC-3 cell viability decreased in a dose-dependent manner in all groups. This decrement was significant in groups III and IV compared to the control group ($P<0.05$) (Figure 4). In 48 hr

treatment, the survival rate decreased in all groups in a dose-dependent manner. It was significant in all groups compared to the control group ($P<0.01$) except group I (Figure 5). In 72 hr treatment, the survival rate decreased significantly in all groups compared to the control group ($P<0.001$) in a dose-dependent manner (Figure 6).

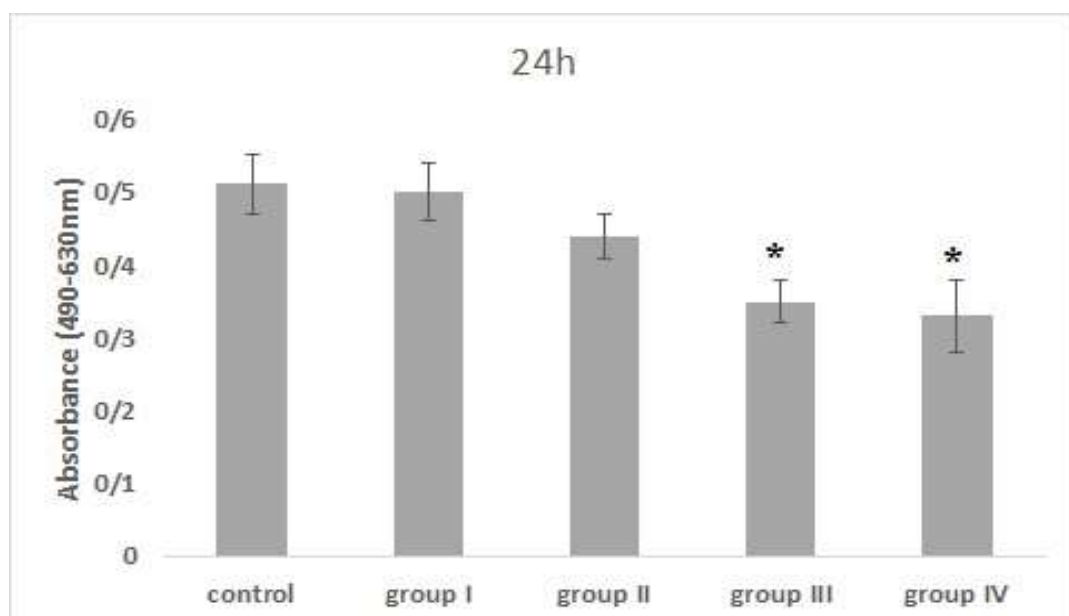


Figure 4. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cell viability for 24 hr of incubation (*: $P<0.05$, significant difference compared to the control group).

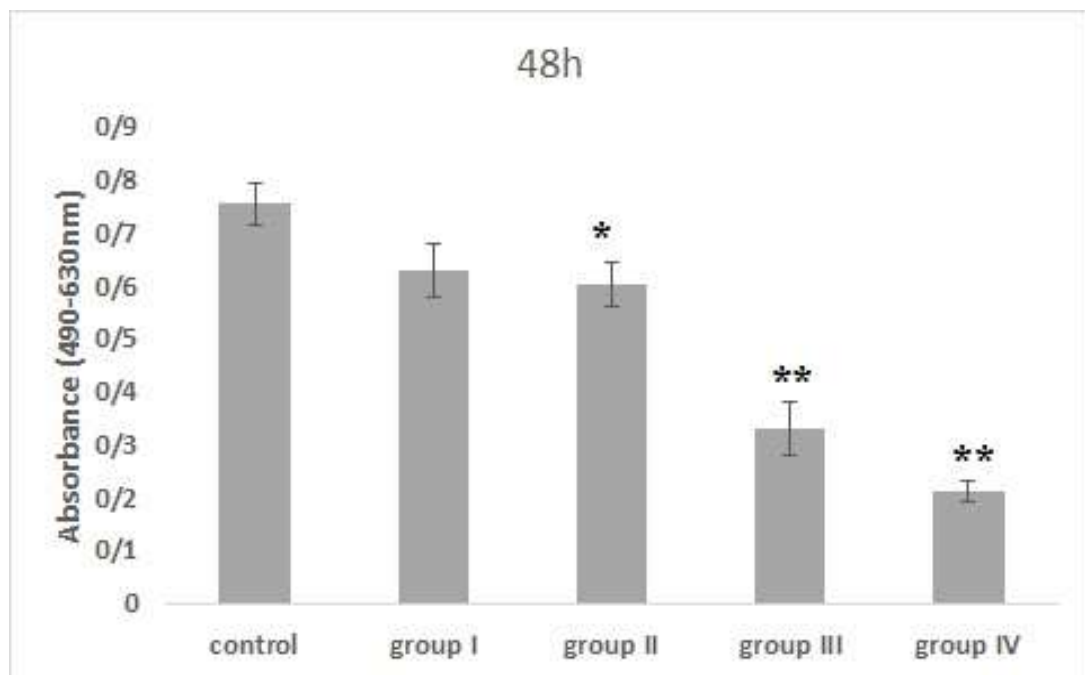


Figure 5. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cell viability for 48 hr of incubation (*: $P<0.01$ and **: $P<0.001$, significant and highly significant differences compared to the control group).

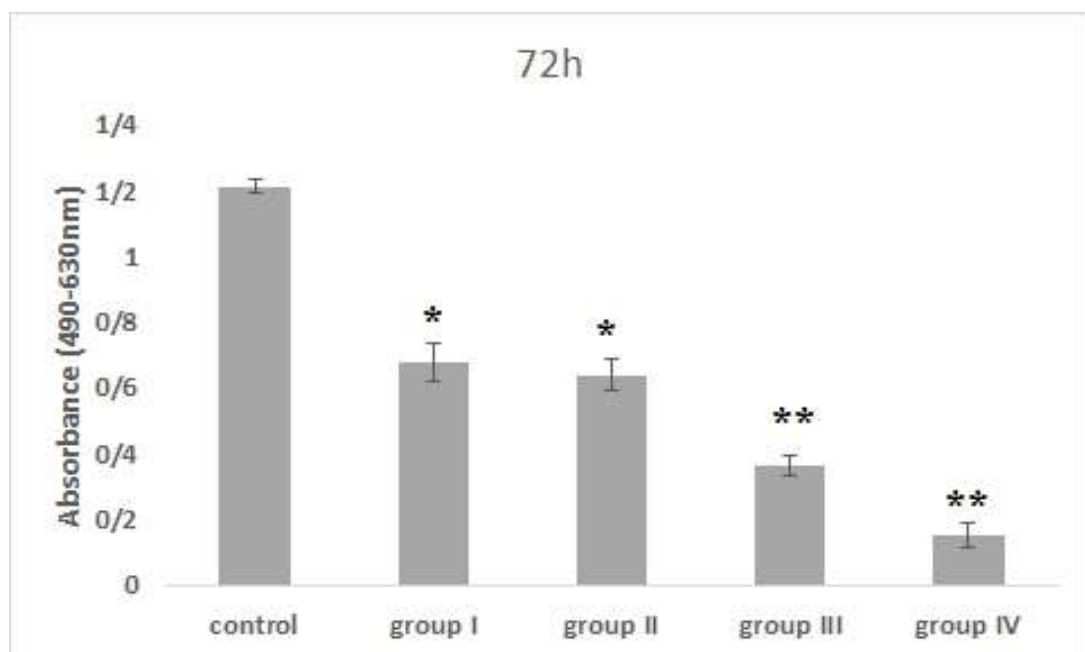


Figure 6. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cell viability for 72 hr of incubation (*: $P<0.01$ and **: $P<0.001$, significant and highly significant differences compared to the control group).

Anxin V-FITC test was used to evaluate the apoptosis. The PC-3 cells were exposed to different concentrations of supernatant for 24, 48 and 72 hr and their effect on the rate of apoptosis was measured. The results indicated an increase in the percentage of cell death in the treated experimental groups (Figures 7, 9 and 11). The percentage of viable cells in the treated groups decreased compared to the control group by increasing

dose and duration of treatment. As can be seen in Figures 7, 9 and 11, the percentage of viable cells decreased in all groups at all three incubation times compared to the control group which was statistically significant. Also, the percentage of cells in the early and late stages of apoptosis increased significantly by increasing the supernatant concentrations and incubation time (Figures 8, 10 and 12).

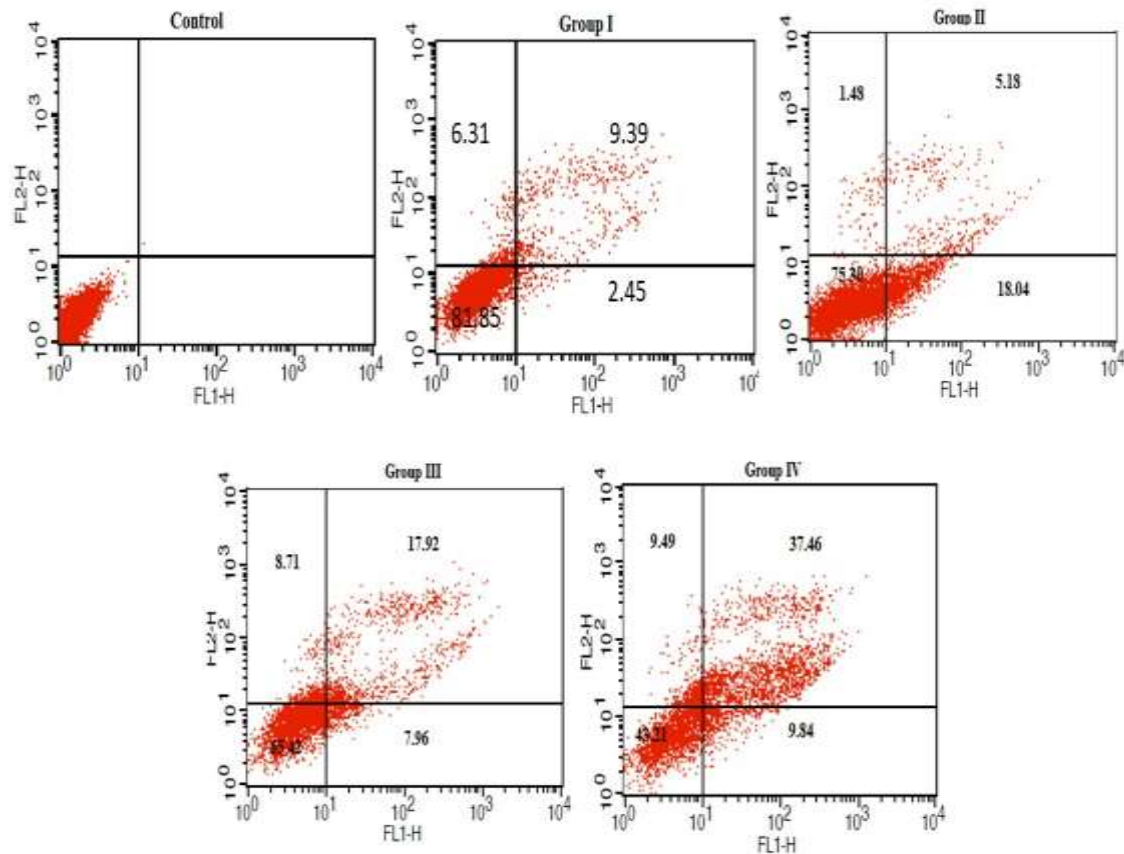


Figure 7. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cells apoptosis. The PC-3 cells were incubated with 5-20 mg/ml of supernatant for 24 hr.

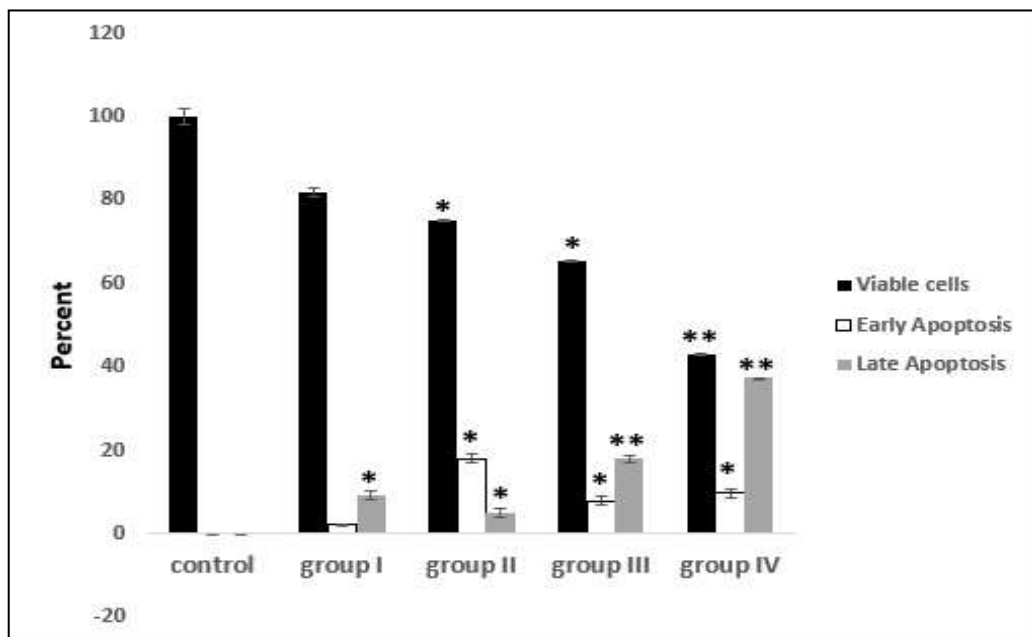


Figure 8. Percentage of viable cells, early apoptosis and late apoptosis in PC-3 cells treated with different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant for 24 hr. *: P-value < 0.05; **: P-value < 0.01 vs. control group.

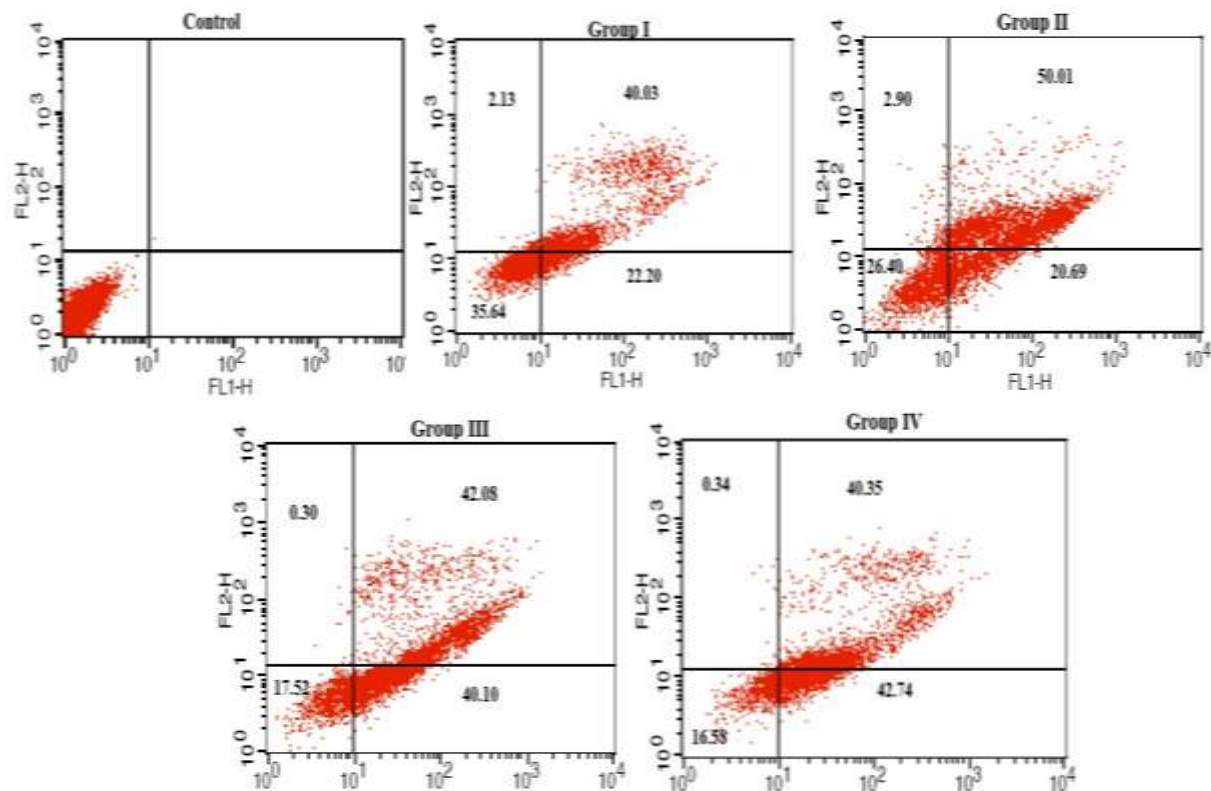


Figure 9. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cells apoptosis. The PC-3 cells were incubated with 5-20 mg/mL of supernatant for 48 hr.

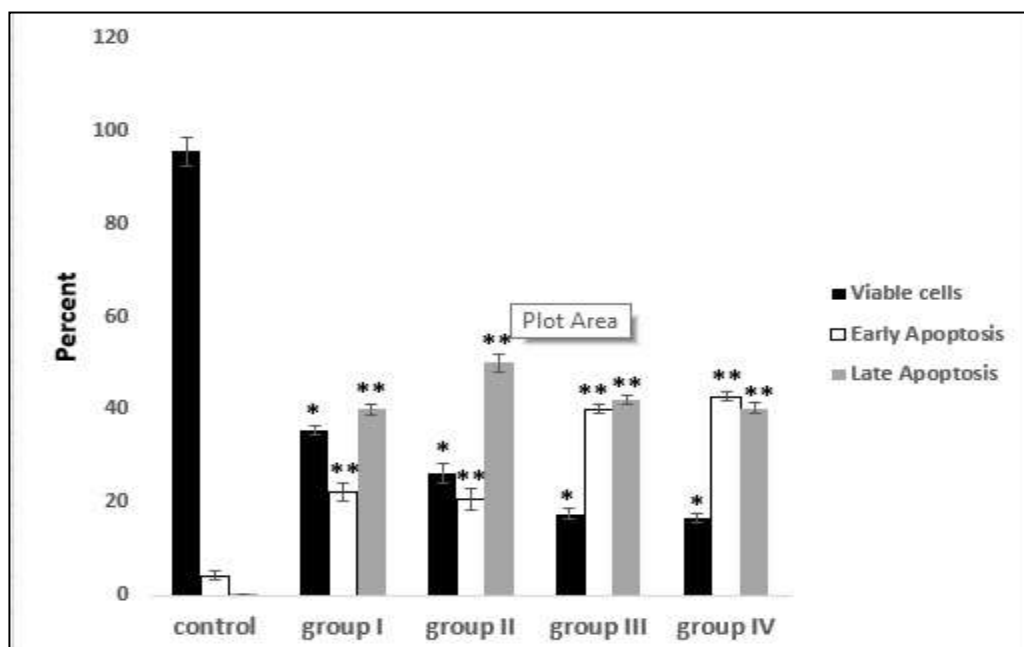


Figure 10. Percentage of viable cells, early apoptosis and late apoptosis in PC-3 cells treated with different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant for 48 hr. *: P-value<0.01; **: P-value<0.001 vs. control group.

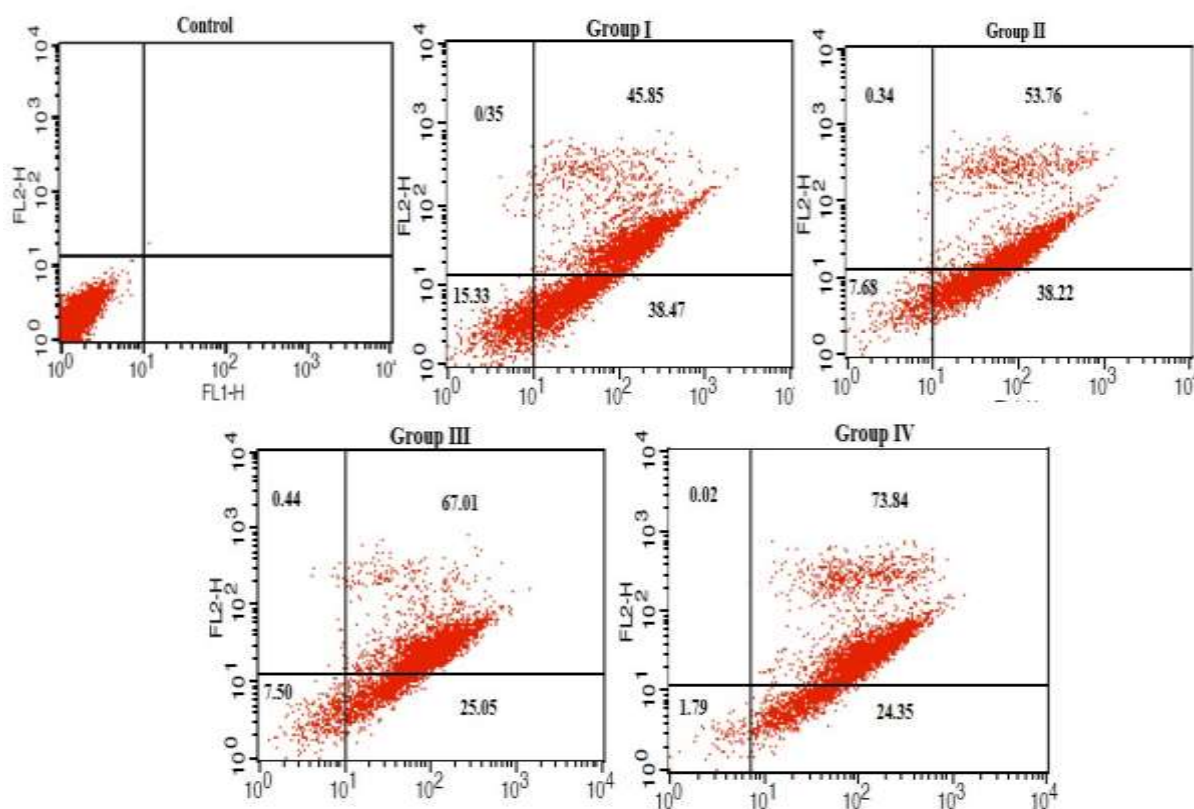


Figure 11. The effect of *Bacillus licheniformis* supernatant on PC-3 cells apoptosis. The PC-3 cells were incubated with 5-20 mg/mL of supernatant for 72 hr.

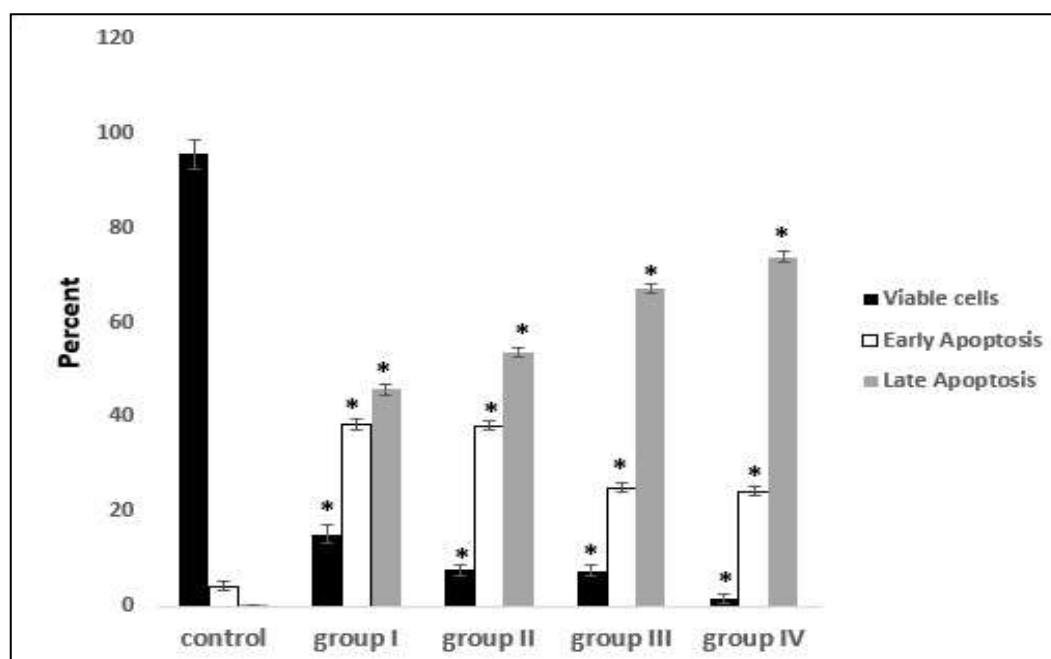


Figure 12. Percentage of viable cells, early apoptosis and late apoptosis in PC-3 cells treated with different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant for 72 hr. *: P-value < 0.001 vs. control group.

Discussion

Due to the spread of cancer as one of the most important and common causes of human mortality, resistance to chemotherapy drugs and several disadvantages and sometimes oncogenic harms of these drugs, the necessity to discover new compounds and create independency from foreign countries in the field of antibiotics production and anti-cancer drugs is felt. On the other hand, due to the fact that rare studies have been conducted in the field of antitumor compounds production from endemic bacteria of Iran, there is a need to identify new endemic strains producing new compounds. Also, the ability to produce antimicrobial substances is not only a defense tool, but also from a pharmacological point of view and due to the side effects of antibiotics and resistance of pathogenic microorganisms against antibiotics, they can be used effectively in the treatment of diseases. Therefore, this study investigated the anti-cancer effects of *Bacillus licheniformis* products against prostate cancer cell line (PC-3) by cytotoxicity assay. In this study, *Bacillus licheniformis* was used as the best isolate in terms of antimicrobial compounds production with a wide range of effects to study anti-cancer activity and the effect of its compounds was investigated on PC-3 cell line viability.

The PC-3 cell line was treated with *Bacillus licheniformis* supernatants in 4 groups. The results of MTS assay in 24 hr incubation with the treatment showed that cell viability was dose-dependent, so that, with increasing the concentration, the cell viability decreased compared to the control group. This decrement was significant in groups III and IV compared to the control group ($P < 0.05$). Also, in the 48 hr treatment, all groups except the first group showed significant differences from the control group ($P < 0.01$) and finally the cells treated for 72 hr, showed a dose-dependent decrease in all groups compared to the control group. It was significant in all groups compared to the control group ($P < 0.001$).

Phonnok *et al.* in 2010 investigated microbial metabolites and their role in the apoptosis induction in cancer cells. They evaluated the effect of 394 microbial extracts on the proliferative activity of 4 categories of cancer cells using MTT assay. Using these extracts, morphological changes such as cell shrinkage, loss of surface contact and loss of cell swelling were observed in all treated cancer cells (15), which can confirm the results of the current study. The cell viabilities showed a concentration-dependent decrease compared to the control group when exposed to different concentrations of supernatant for 24, 48 and 72 hr.

In 2010, Tuo *et al.* tested the anti-proliferative effect of 7 wild *Lactobacillus* strains isolated from

food fermentation on HT-29 cell line isolated from laboratory models. The results showed that only *Lactobacillus coryniformis* strain had anti-proliferative activity on HT-29 cells (19). In the present study, different concentrations of *Bacillus licheniformis* supernatant were able to inhibit the PC-3 cell line growth.

Moosavi *et al.* in 2011 investigated the effect of the secondary metabolites from *Streptomyces* sp. ABRIINW 111 on K562 cell apoptosis. In their study, K562 cell was treated with different concentrations of ether-soluble metabolites for 12 to 72 hr. Trypan blue dye and DNA fragmentation test were used to investigate the growth inhibition and apoptosis occurrence, respectively. The data showed that ether-soluble metabolites inhibited the growth of K562 cell line in a concentration- and time-dependent manner (20). The current study has presented similar results to Moosavi's study in terms of examining the effect of produced compounds on cancer cell line and apoptosis. In addition, Annexin kit and flow cytometry method were used in the present study.

In a 2013 study, Parsaseresht *et al.* examined the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG secondary metabolites on Cacoll cancer cell (colorectal cancer cell line) and showed that, *Lactobacillus rhamnosus* GG metabolites inhibited Cacoll cancer cell growth at concentrations of 100, 200 and 300 mg/mL by 60.8%, 72.5% and 82.1%, respectively (16). These findings are in line with the findings of the present study on the anti-cancer effects of microbial compounds. In 2013, Mahmoudi Aslzadeh *et al.* examined the probiotic effect of *Bifidobacterium bifidum* on Cacoll cancer cells. To this purpose, 100, 200 and 300 μ L of the supernatants were applied to the Cacoll cancer cells cultured in 96-well microplates. The results showed inhibitory percentage of *Bifidobacterium* supernatant on cancer cells at 55% to 82%, which were related to the concentration of 100 μ L in 24 hr and 300 μ L in 72 hr, respectively (21). In this study, selective bacterial supernatant was used and similar results were obtained.

In 2014, Vijaya Kumar *et al.* examined the effect of metabolites of *Bacillus cereus* and *Bacillus popilliae* isolated from the infected specimens in Shimoga, Karnataka, India, to investigate the anti-cancer and cytotoxic properties of various components. The extracts obtained from the metabolites of these two bacteria were used on normal human liver cells and 2 types of cancer cells. The results indicated that both samples had significant activity. However, the sample taken from *Bacillus cereus* showed a high cytotoxic effect, but the metabolites of *Bacillus popilliae* had toxic effects on normal and cancer cells (22). These results are similar to the present research, except that

in the present study no toxic effects were observed on normal cells.

In 2015, Vazquez-Rivera *et al.* in Mexico investigated the cytotoxic effects of the dipeptide cycle of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on apoptosis in human cancer cell lines. These compounds showed 50% inhibitory effect (23), which confirms the results obtained in the current study.

Pasiar *et al.* in 2016 studied the selective growth inhibition of the breast adenocarcinoma cell line using metabolites produced by the endemic strain *Pseudomonas UW4* sp. in the laboratory. In this study, the antimicrobial activity of the metabolites of the endemic strain *Pseudomonas UW4* sp. was investigated against some pathogenic bacteria. To evaluate the anti-cancer activity, SKBR3 and HU-02 cells were treated with different concentrations of 5, 10, 15 and 20 mg/mL for 24, 48 and 72 hr. The obtained results showed that *Pseudomonas UW4* sp. was able to produce antimicrobial metabolites against *Staphylococcus aureus*. Metabolite treatment showed that by increasing the concentration in a dose- and time-dependent manner, the viability of the cells decreased. The maximum effect was related to 20 mg/ml concentration at 72 hr treatment. While metabolites at different concentrations did not have a significant effect on normal fibroblasts (18), these results confirmed the present study results.

Zhang *et al.* in 2017 examined the antitumor property of *Rhodococcus* sp. Lut0910 isolated from contaminated soil. The effects of those metabolites were investigated on two categories of liver cancer cells (HepG2) and uterine cancer cells (Hela). Treatment of these cancer cells with the bacterium *Rhodococcus* Lut0910 extract delayed cell proliferation in a dose-dependent pattern. Also, oral administration of the mentioned bacterial extract to the mice with specific tumors resulted in inhibition of the tumor growth in comparison with the control group (1). This study outcome in the field of cytotoxic effects of microbial production compounds was in line with the present study.

Dehnad *et al.* in 2017 investigated antimicrobial, chemical and histopathological properties of the secondary metabolites of *Streptomyces levis* isolated from the soils in the Northwest of Iran in *in-vitro* and *in-vivo* conditions. Their data showed that only the

ether metabolite had effect on all gram-positive and gram-negative microbial strains. The histopathological examination results showed that the bacterial metabolite has a significant healing effect on *Staphylococcus aureus* wound. The antimicrobial and antitumor activities can be due to the presence of 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester and bis (2-ethylhexyl) phthalate in the metabolite composition (24), which were in line with the present study findings on the anti-cancer effects of the microbial compounds.

Conclusion

The results of MTS and annexin tests showed that the rate of apoptosis in PC-3 cell line increased significantly by increasing the concentration of *Bacillus licheniformis* supernatant. Considering that cell proliferation and irregular apoptosis are the characteristics of cancer cells, *Bacillus licheniformis* supernatant can be used to reduce cell proliferation and increase apoptosis for the prevention and treatment of prostate cancer.

Acknowledgment

We would like to express our gratitude and thanks to all those who helped us during the implementation of this research. It is worth mentioning that this article is the result of a part of the Ph.D thesis of Mr. Ahmadreza Shahniani from the Islamic Azad University, Kazerun Branch. This article was financially supported by the authors.

Ethical considerations

Ethical issues (Including plagiarism, informed consent, misconduct, data fabrication and/or falsification, double publication and/or submission, redundancy, etc.) have been completely observed by the authors.

Funding and support

This research resulted from an independent research without receiving any financial support.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interest.



القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان پروستات (PC-3) با استفاده از سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* در شرایط آزمایشگاهی

احمد رضا شهینیانی^۱، زهرا بهزاده^{۲*}، فهیمه محمودنیا^۳، لیلیا روحی^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات سلولی و تکوینی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سرطان از شایع‌ترین عوامل مرگ و میر انسانی است. در نتیجه ضرورت یافتن ترکیبات جدید با منشا طبیعی از باکتری‌های بومی احساس می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سیتوتوکسیک ترکیبات تولیدی باکتری گرم‌مثبت خاکری بر میزان آپوپتوزیس سلول‌های سرطان پروستات (PC-3) انجام شد.

مواد و روش کار: تعداد ۷۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری (ایران) در بهار سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شدند و روی محیط‌های نوترینت آگار و تربیتی‌سوی آگار کشت داده شدند. به‌دنبال شناسایی سویه‌های گرم‌مثبت، بهترین سویه از لحاظ فعالیت ضد میکروبی با استفاده از سکانس ژن 16S rRNA شناسایی شد. سپس برای بررسی فعالیت سیتوتوکسیک، رده سلولی PC-3 در غلظت‌های مختلف سوپرناتانت (مایع رویی) سویه انتخابی در مدت زمان‌های انتخابی تیمار شد و سپس میزان توان زیستی و آپوپتوزیس توسط تست MTS و آنکسین بررسی شد.

یافته‌ها: از ۷۰ نمونه خاک ۴۶۷ باکتری گرم‌مثبت جداسازی شد که ۹ سویه از آن‌ها توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی را داشتند. از بین آن‌ها سویه *Bacillus licheniformis* که ترکیبات ضد میکروبی بهتری تولید می‌کرد، برای بررسی میزان توان زیستی و آپوپتوزیس روی رده سلول‌های PC-3 انتخاب شد. تست MTS با آنکو باسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته سلول‌ها با تیمار نشان داد که میزان توان زیستی وابسته به دوز است و با افزایش غلظت، میزان توان زیستی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.05$). میزان القاء آپوپتوزیس در سلول‌های PC-3 با افزایش غلظت سوپرناتانت به صورت وابسته به دوز و زمان به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P < 0.05$). بیشترین تأثیر سوپرناتانت مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از ترکیبات به‌دست‌آمده از باکتری‌های گرم‌مثبت خاکری می‌توان به درمان سلول‌های سرطان پروستات پرداخت.

کلید واژه‌ها: خاک، *Bacillus licheniformis*، سرطان پروستات، MTS، آپوپتوز

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۹

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۲۹

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

نویسنده مسئول:

زهرا بهزاده، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛ ایمیل:

Bamzadehz@yahoo.com

مقدمه

نفر در سال ۲۰۳۰ برسد که این به دلیل رشد قابل توجه جمعیت مسن در جهان، تغییر سبک زندگی و تغییرات اقتصادی در جامعه است (۱).

به‌طوری‌که در کشورهای توسعه‌یافته، سرطان پروستات دومین سرطان رایج (پس از سرطان پوست) و دومین سرطان مرگ‌آور (پس از سرطان ریه) در مردان است. به‌طوری‌که از هر شش مرد یک نفر به

امروزه سرطان یکی از مهمترین چالش‌های سلامتی در جهان بوده و ۲۵ درصد مرگ و میر در آمریکا به دلیل بروز سرطان است. کشورهای آسیایی که ۶۰ درصد جمعیت جهان را تشکیل می‌دهند، نیمی از سرطان‌ها در این کشورها رخ می‌دهد. این چنین برآورد شده است که آغاز سرطان از ۶/۱ میلیون نفر در سال ۲۰۰۸ تا ۱۰/۶ میلیون

تشخیص و غربالگری سرطان پروستات معاینه غده پروستات توسط معاینه انگشتی رکتوم است. تشخیص سریع سرطان پروستات با اندازه‌گیری آنتی‌بادی ویژه پروستات با استفاده از آزمایش‌های غربالگری این بیماری است. در بیمارانی که به سرطان پروستات مبتلا هستند، مقدار این آنتی‌بادی در سطح بالاتری است. در برخی از موارد عفونت و یا بزرگی خوش خیم حجم غده پروستات می‌تواند سبب افزایش میزان Prostate-Specific Antigen (PSA) در خون شود. از این رو، ترکیب معاینه مقعد توأم با تعیین سطح PSA در خون روش دقیق‌تری برای تشخیص سرطان پروستات است. در مراحل بعدی آزمون‌های دیگری مانند MRI، سونوگرافی، توموگرافی کامپیوتری و نمونه‌برداری از غده نیز انجام می‌شود (۷).

راه‌کارهای مرسوم درمانی سرطان پروستات عبارتند از: جراحی (برداشتن کامل غده پروستات یا پروستاتکتومی) (۸)، جراحی سرد یا سرامدرمانی (۹)، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و ژن درمانی (۱۰). مکانیسم‌های مختلفی وجود دارند که از طریق آن‌ها این ترکیبات قادر به کنترل سلول‌های توموری مختلف هستند که این مکانیسم‌ها شامل القای آپوپتوزیس، افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندریایی، متوقف کردن و بلوکه کردن سیگنال‌های ترانسداکشنی (مجموعه فرایندهایی که در مسیر متابولیسمی رخ می‌دهد) از طریق مهار آنزیم‌های کلیدی، تغییرات سیتومورفولوژیکی به دلیل ایجاد اختلال در تمایز سلولی، و آنژیوژنز القا شده به وسیلهٔ تومور هستند. ترکیبات ضدتوموری تولیدشده به وسیلهٔ استرپتومایسین گهگاهی از طریق مختل کردن DNA دورشته‌ای عمل می‌کنند که منجر به تاثیرات زیان‌بار روی تکثیر سریع سلول‌ها از طریق مهار کردن فعالیت RNA پلیمرز وابسته به DNA می‌شود (۱۱).

در نهایت، صرف‌نظر از اینکه روش‌های مختلفی برای درمان سرطان وجود دارد، ولی هنوز سرطان به‌عنوان یک نگرانی و مشکل عمومی محسوب می‌شود. شیمی‌درمانی یکی از موثرترین روش‌ها برای کنترل سرطان است ولی این روش نیاز به تامین مداوم ترکیبات ضدتوموری جدید دارد. درمان سرطان هنوز هم یک مشکل اساسی برای پزشکان و صنایع داروسازی است. بیش از ۶۰ درصد از عوامل شیمی‌درمانی که امروزه برای درمان سرطان به‌کار می‌روند، ترکیبات هستند که از میکروارگانیسم‌های خاک شناسایی شده و یا ترکیبات سنتز شده از آن‌ها با ویژگی‌های تغییر یافته هستند (۱۲). چراکه خاک زیستگاه موجودات زندهٔ متنوعی شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوآها، نماتودها، حشرات و بسیاری موجودات زنده دیگر است. در سطوح خاک جمعیت باکتری‌ها می‌تواند به 10^8 تا 10^9 سلول به ازای هر گرم وزن خشک خاک برسد. باکتری‌های خاکزی تنوع فراوانی دارند و

سرطان پروستات مبتلا می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژی نیز نشان داده‌اند که عامل‌های وراثتی در بروز این بیماری در ۱۰ درصد موارد نقش دارند. بیشترین فراوانی سرطان پروستات در آفریقا و کمترین میزان آن در جمعیت آسیایی دیده می‌شود (۲). از طرفی اولین جایگاه ژنی که در ارتباط با سرطان پروستات شناخته شد، جایگاه Hereditary Prostate Cancer locus-1 (HPCL) بود. پس از این کشف چندین ژن نامزد دیگر هم شناخته شده‌اند، اگرچه بیشتر آن‌ها به دلیل فراوانی پایین از اهمیت کمتری برخوردار هستند. اکثر تومورهای پروستات آدنوکارسینوما هستند. سابقهٔ ارثی سرطان پروستات عامل مهمی در ابتلا به این سرطان است. عامل‌های ارثی در درصد کمی از موارد سرطان پروستات درگیر بوده و معمولاً با شروع زودرس آن همراه هستند. در مردان، افزایش سطح آندروژن همراه با افزایش خطر سرطان پروستات است. ژن گیرنده آندروژن نقش مهمی در بروز و پیشرفت سرطان پروستات دارد. همچنین همچنین ژن‌های AR و HSD3B1، HSD3B2، SRD5A2 و CYP17 در متابولیسم آندروژن تکثیر سلولی در پروستات جایگاه ویژه‌ای دارند. برخی چندشکلی‌ها در این ژن‌ها با افزایش خطر سرطان پروستات همراه است. جهش در گیرنده آندروژن تقریباً در همه موارد سرطان پروستات دیده می‌شود، و راه‌کارهای درمانی برای این سرطان بر کاهش یا حذف اتصال تستسترون به گیرندهٔ آندروژن تاکید دارند. تغییرات اپی‌ژنتیک، به‌ویژه هیپرمتیلایسیون DNA در نواحی پروموتور نقش مهمی در کاهش بیان ژن‌های مهمی برای مراقبت و پیشگیری از بروز سرطان پروستات دارند. شماری از تغییرات مولکولی و ژنتیکی در سرطان پروستات مشاهده شده است. این موارد در شروع و پیشرفت سرطان پروستات نقش دارند. ژن‌های مهار کننده متاستاز هم در سرطان پروستات شناخته شده‌اند. هیپرمتیلایسیون نواحی پروموتور برخی ژن‌ها که در آپوپتوزیس نقش دارند نیز در سرطان شناخته شده است. سرطان پروستات، در واقع حضور سلول‌های سرطانی در این عضو، به دلیل افزایش آندروژن غدد فوق کلیوی است که موجب انسداد در دستگاه ادراری می‌شوند (۳،۴). علایم هشداردهندهٔ اصلی سرطان پروستات شامل: ادرار کردن پی در پی یا دشوار، جاری شدن ضعیف ادرار، عدم توانایی در ادرار، بی‌اختیاری ادراری، جریان منقطع و ضعیف ادرار، وجود خون در ادرار، خروج منی همراه با درد، درد مداوم بخش پایین کمر و ناتوانی جنسی است (۵). مستقل از جنس و منشاء نژادی احتمالاً قوی‌ترین خطر عامل شناخته شده در این مورد سابقه ابتلاء خانوادگی است. سرطان پروستات رایج‌ترین سرطانی است که در مردان آمریکایی تشخیص داده می‌شود. احتمال اینکه یک مرد که سیگار هم مصرف نمی‌کند به سرطان پروستات مبتلا شود، نسبت به سرطان‌های دیگر حدود ۱۷ درصد بیشتر است (۶). یکی از روش‌های

پروستات (PC-3) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش پژوهش

مطالعه حاضر مقطعی-توصیفی است که معیار ورود سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* و معیار خروجی اثر سوپرناتانت بر القای آپو توئیزیس در سلول‌های سرطان پروستات (PC-3) است.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت از نمونه‌های خاک
در این مطالعه ۷۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری در بهار ۱۳۹۸ از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی متری کنار ریشه گیاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه، جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت انتقال داده شد (۱۴). به دنبال کشت و خالص‌سازی باکتری‌ها، جهت شناسایی فنوتیپی آن‌ها، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی هر جدایه بررسی شد (۱۵، ۱۶). در نهایت به دنبال شناسایی اولیه، بهترین جدایه از لحاظ تولید ترکیبات ضد میکروبی با طیف اثر گسترده‌تر، با استفاده از روش شناسایی مولکولی تعیین هویت گردید.

شناسایی مولکولی باکتری گرم مثبت تولیدکننده ترکیبات ضد میکروبی

جهت شناسایی ژنوتیپی از سکانس ژن 16S rRNA استفاده گردید. ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن-ایران) انجام گرفت. سپس برای اطمینان از خالص بودن DNA، جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ خوانده شد که نسبت آن باید از ۱/۸ بالا باشد. در غیر این صورت DNA ناخالص تلقی می‌گردد. در ادامه پرایمرهای فوروارد و ریورس برای ژن 16S rRNA توسط شرکت سیناژن ایران تهیه شد (جدول ۱).

می‌توانند هوازی، بی‌هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری باشند. علاوه بر این، از نظر نوع تغذیه می‌توانند هتروتروف یا اتوتروف باشند (۲). از طرفی مطالعات نشان داده است که خاک و منطقه ریزوسفر حاوی هزاران گونه باکتریایی منحصر به فرد در هر گرم خاک است. با این حال امروزه تنها بخش بسیار کمی از این باکتری‌هایی که قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه زیستی هستند، کشت و مطالعه شده‌اند. مطالعات نشان داده است که حتی سوبیه‌هایی از باکتری‌ها قادر به تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه هستند که به وسیله خوشه‌های ژنی کد می‌شوند که این ژن‌ها در شرایط آزمایشگاهی بیان نمی‌گردند. متابولیت‌های ثانویه به‌طور مستقیم در رشد، نمو یا تکثیر باکتری‌هایی که آن‌ها را تولید می‌کند نقش ندارند ولی این متابولیت‌ها ممکن است نقش‌های اکولوژیکی در میان‌کنش باکتری‌های تولیدکننده آن‌ها با ارگانیسم‌های دیگر داشته باشند (۱۳). به عبارت دیگر بسیاری از متابولیت‌های میکروبی داروهای ضروری برای درمان سرطان هستند. کاربرد درمانی آن‌ها از سال ۱۹۴۰ و با کشف اکتینومایسین شروع شده و از آن پس ترکیبات جدید زیادی با ویژگی‌های ضد سرطانی از منابع طبیعی شناسایی و جداسازی شده‌اند (۱۲).

در نهایت با توجه به گسترش شایع و روزافزون سرطان که یکی از مهمترین و شایع‌ترین عوامل مرگ و میر انسانی است، نیاز برای کشف ترکیبات جدید و ایجاد استقلال در زمینه تولید متابولیت‌های ضد سرطانی و عدم وابستگی به کشورهای بیگانه احساس می‌شود. از طرفی از آنجا که تاکنون مطالعات کمی در زمینه تاثیر متابولیت‌های تولیدی میکروبی بر روی سلول‌های سرطانی صورت گرفته است و نیز با توجه به نیاز جامعه در جهت شناسایی ترکیبات فعال زیستی تولیدی جدید توسط باکتری‌های بومی، لذا در این تحقیق اثرات ضدسرطانی ترکیبات استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* جداسازی شده از خاک استان چهارمحال و بختیاری علیه رده سلولی سرطان

جدول ۱. توالی پرایمرهای فوروارد و ریورس برای ژن 16S rRNA (۱۷)

پرایمرها	5'→3'
1000F16	CAACGAGCGCAACCC
1492 R	GGTTACCTTGTTACGACT

کرده و نهایتاً فرایند PCR توسط دستگاه ترمال سیکلر (اپندورف-آلمان) انجام شد.

در این تکنیک برای آغاز فرآیند پلی‌مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به مدت ۱۸۰ ثانیه بر روی دمای ۹۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید و متعاقباً ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه

برای تهیه مستر میکس با حجم ۲۵ میکرولیتر، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس (با غلظت $10\text{ pmol}/\mu\text{L}$)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم پلی‌مراز و ۱ میکرولیتر از DNA الگو را مخلوط

گروه I: سلول‌ها در معرض غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* قرار گرفتند.

گروه II: سلول‌ها در معرض غلظت ۱۰ میلی گرم/میلی لیتر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* قرار گرفتند.

گروه III: سلول‌ها در معرض غلظت ۱۵ میلی گرم/میلی لیتر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* قرار گرفتند.

گروه IV: سلول‌ها در معرض غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* قرار گرفتند.

گروه کنترل: سلول‌ها در معرض محیط کشت RPMI1640 (شرکت Sigma) قرار گرفتند کیت MTS (Promega)، یک آزمون کمی و رنگی است. احیاء MTS، به وسیله آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد. برای بررسی در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خان‌های 5×10^3 سلول کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف متابولیت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر (گروه I، II، III و IV) جایگزین و سلول‌ها برای ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت در شرایط کشت نگهداری شدند. از سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل استفاده شد. بعد از گذشت زمان‌های 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 داده‌ها به صورت میانگین \pm SD بیان شدند (۱۸).

القای آپوپتوزیس در رده سلولی PC-3، از طریق تست FITC Annexin V، با استفاده از کیت Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، با شماره محصول (۵۵۶۵۴۷)، مورد ارزیابی قرار گرفت. از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر متابولیت در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ برای بررسی آپوپتوزیس استفاده شد. سلول‌ها را پس از شستشو با PBS و آنزیم تریپسین (Gibco، آمریکا) از پلیت جدا نموده و سانتریفیوژ شدند. رنگ‌های Annexin-V متصل به FITC (BD-PI Propidium iodide; BD Pharmingen) و (BD Pharmingen) به میزان ۵ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند و آماده شمارش توسط دستگاه فلوسایتمتری (FACS Calibur، آمریکا) شمارش سلولی در واحد 10^4 صورت گرفت، شدند (۱۸).

سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت ۶۰ ثانیه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۳۰۰ ثانیه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد (۱۷).

سپس برای اطمینان از تکثیر ژن 16S rRNA، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. در نهایت جهت تعیین توالی ژن 16S rRNA، ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR به کمپانی ماکروجین کره فرستاده شد. پس از تعیین توالی ژن 16S rRNA جدا شده، توالی ژنی به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST موجود در سایت NCBI ارزیابی شد (۱۷).

کشت *Bacillus licheniformis*

به منظور جداسازی ترکیبات تولیدی، *Bacillus licheniformis* در محیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth)، به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد، سپس سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه بر روی آن انجام گرفت، به دنبال آن سلول‌ها از سوپرناتانت (مایع رویی) جداسازی و از آن برای بررسی فعالیت سیتوتوکسیک استفاده شد. برای این منظور مقدار ۲ cc از سوپرناتانت درون ویال‌های لیوفیلیزه ریخته و درون دستگاه لیوفیلیزاتور، به مدت ۷ ساعت فریز و سپس خشک شد. نمونه‌های تهیه شده تا زمان استفاده برای بررسی تاثیرات سیتوتوکسیک در فریزر -۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۴).

بررسی تاثیرات سیتوتوکسیک سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر روی رده سلولی سرطانی PC-3

در پژوهش حاضر رده سلولی PC-3 سلول‌های سرطان پروستات از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه شد. PC-3 یک رده سلول‌های سرطانی پروستات است که در تحقیقات سرطان پروستات و تولید دارو استفاده می‌شود. رده سلولی PC-3 در سال ۱۹۷۹ از متاستاز استخوانی درجه ۴ سرطان پروستات در یک مرد ۶۲ ساله قفقازی گرفته شده است.

پس از انتقال فلاسک T-25 از مرکز انستیتو پاستور ایران، محیط رویی سلول‌ها برداشته شده و محیط تازه (RPMI+FB10%+Pen/Strep1%) (شرکت Sigma) به آن‌ها اضافه شد و سپس به درون انکوباتور CO₂ دار (دمای ۳۷ درجه سلسیوس، CO₂ ۵٪ و O₂ ۹۵٪) منتقل شدند.

گروه‌های آزمایشی: برای بررسی تاثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر آپوپتوزیس سلول‌های سرطان پروستات انسان (PC-3)، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف قرار گرفتند.

میکروبی شناسایی شد. بهترین جدایه از لحاظ تولید ترکیبات ضد میکروبی با طیف اثر گسترده‌تر، توسط تکنیک شناسایی مولکولی تعیین هویت شد. نتایج آلاینمنت ژن 16S rRNA نشان داد که بهترین سویه از لحاظ تولید ترکیبات ضد میکروبی *Bacillus licheniformis* است (شکل ۱). در نهایت سویه انتخابی برای بررسی تاثیرات سیتوتوکسیک استفاده گردید.

بررسی تاثیرات سیتوتوکسیک سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* روی رده سلولی سرطانی PC-3

مشاهدات میکروسکوپی نشان‌دهنده تغییرات مورفولوژی و کاهش تعداد سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده به صورت وابسته به غلظت و زمان است (شکل ۲ و ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها و آنالیز آماری آن نیز با استفاده از نرم‌افزار t-test و تست پارامتریک ANOVA انجام شد. برای تعیین این که کجا اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با هم و با گروه کنترل وجود دارد، $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه شده است و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

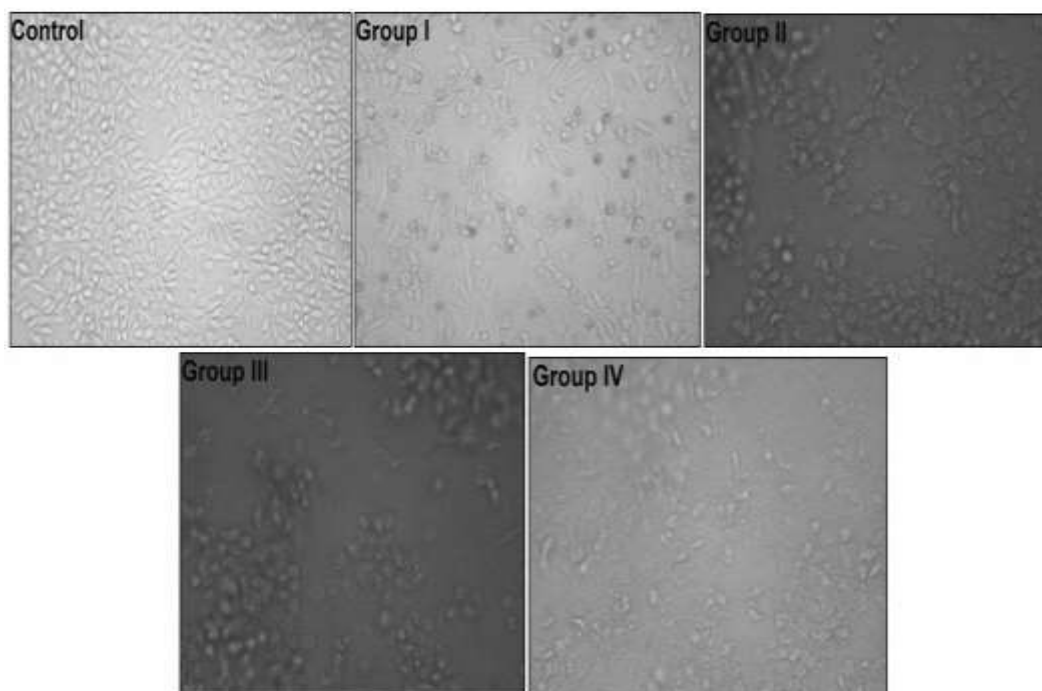
یافته‌ها

در این پژوهش پس از جمع‌آوری و آماده‌سازی ۷۰ نمونه خاک از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری، مراحل غربال‌گری بر روی هریک از آن‌ها به طور جداگانه انجام گرفت. از کشت نمونه‌های خاک بر روی محیط نوترینت آگار و تریپتی سوی آگار و خالص سازی کلنی‌های بدست آمده، ۴۶۷ کلنی باکتری گرم مثبت جداسازی گردید. از میان آن‌ها ۹ جدایه گرم مثبت با توانایی تولید متابولیت‌های ضد

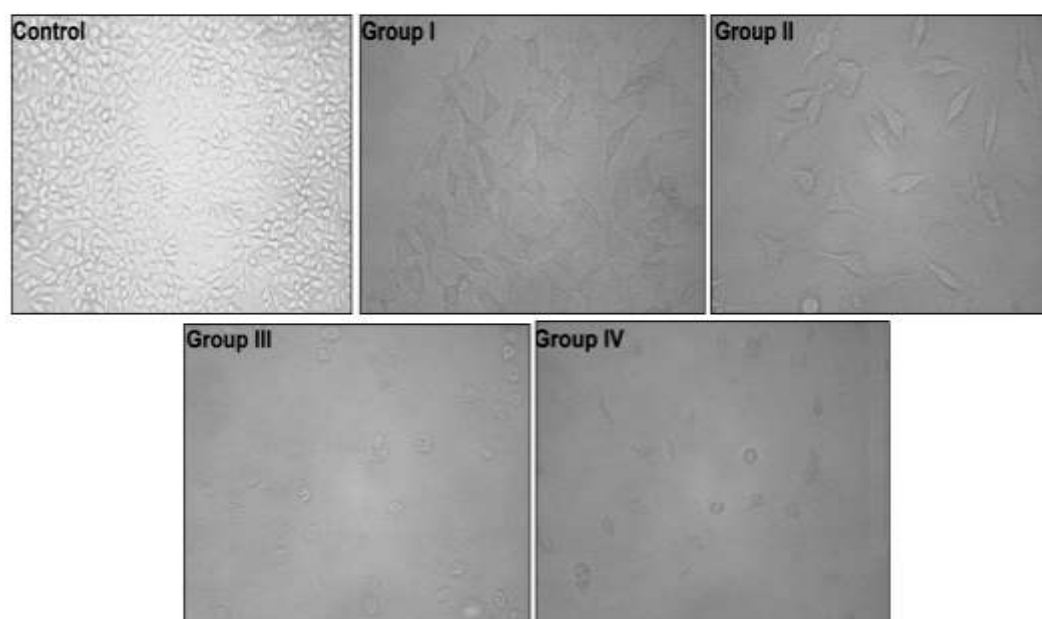
Sequence ID: [dbj|AB275356.1](#) Length: 1501

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
555 bits(300)	2e-154	348/371(94%)	4/371(1%)	Plus/Plus
Query 16 TTGCGGC-CTCTAAGGTGACTGCCGGTGA-TAACCGGAGGAAgggggggATGACGTCAA				73
Sbjct 1126 TTG-GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA				1184
Query 74 TCATCCTGCCCTTATGACCTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGGCATAACAAAGGGCAA				133
Sbjct 1185 TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAG				1244
Query 134 CGAACCCCCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAATTCGGATCGCAATCTGCA				193
Sbjct 1245 CGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA				1304
Query 194 ACTCCACTGCCTGAAGCTGGAATCCCTAGTAATCCCGGATCAACATGCCGCGGTGAATAC				253
Sbjct 1305 ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC				1364
Query 254 CTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG				313
Sbjct 1365 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG				1424
Query 314 GTGAGGTAACCTTTTGGAAACCAGCCGCCCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT				373
Sbjct 1425 GTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT				1484
Query 374 A-CATGTAACC				383
Sbjct 1485 AACAGGTAACC				1495

شکل ۱. آنالیز آلاینمنت ژن 16S rRNA سویه انتخابی



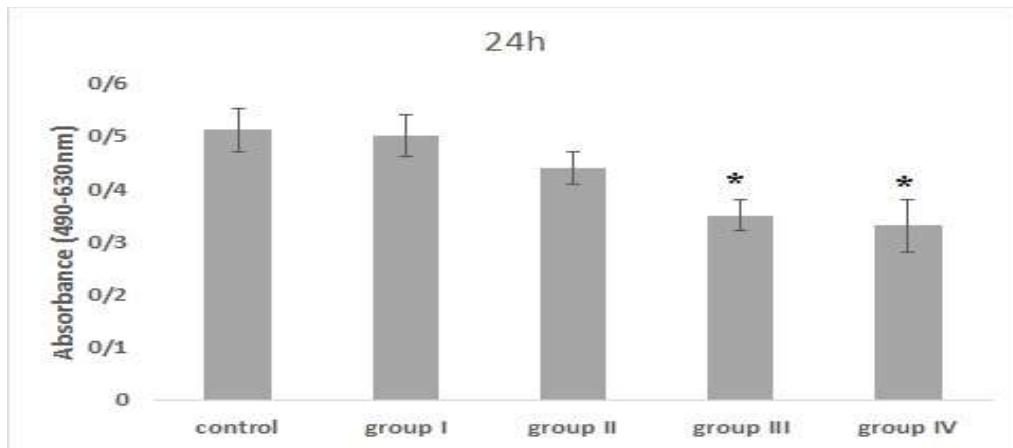
شکل ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر رده سلول‌های PC-3 در مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون



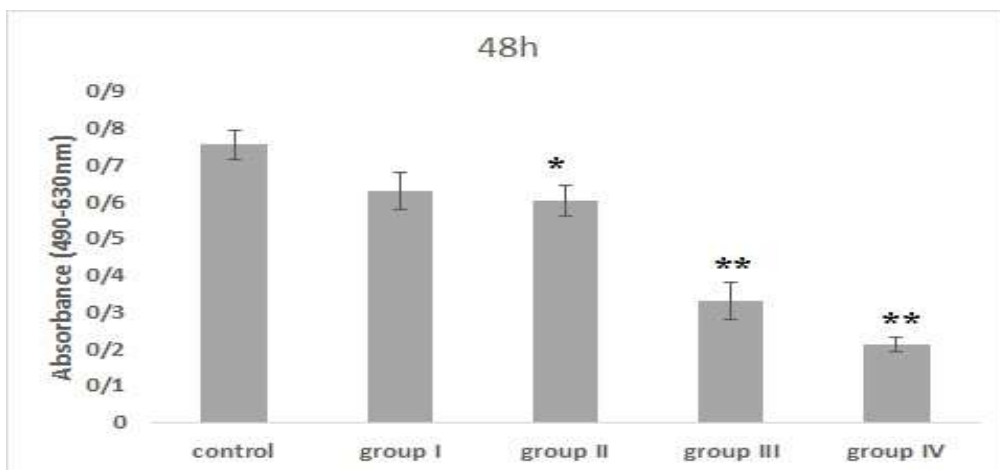
شکل ۳. تاثیر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر رده سلول‌های PC-3 در مدت زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون

صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که این اختلاف نسبت به گروه کنترل به جز گروه I معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (شکل ۵). در تیمار ۷۲ ساعته، در همه گروه‌ها میزان بقا، به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بودند ($P < 0.01$) (شکل ۶).

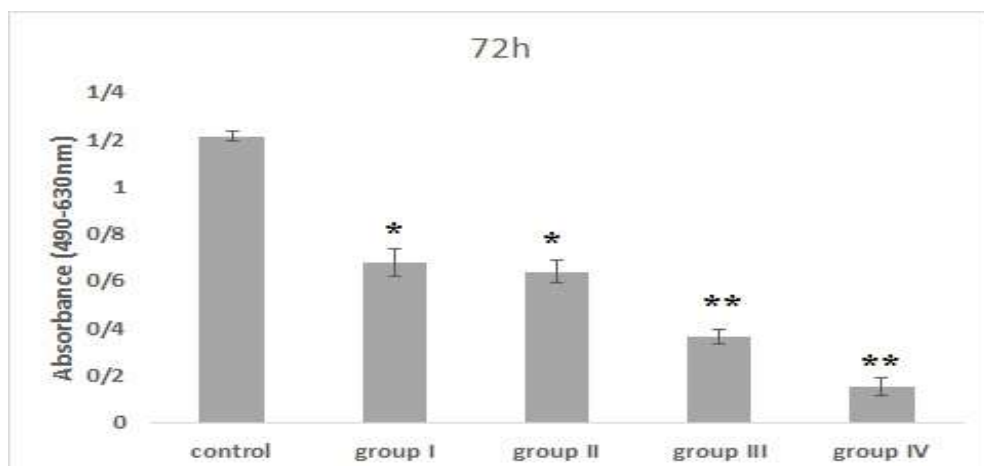
تاثیر غلظت‌های مختلف سوپرناتانت در رده PC-3 بر میزان بقا، سلولی ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت پس از تیمار اندازه‌گیری شد. در تیمار ۲۴ ساعته، در همه گروه‌ها توان زیستی رده PC-3 به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا کرد که گروه III و IV نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بودند (شکل ۴). در تیمار ۴۸ ساعته، در همه گروه‌ها میزان بقا، به



شکل ۴. تأثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر میزان توان زیستی رده سلولی PC-3 در مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون. (*= $P<0/05$), اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل)



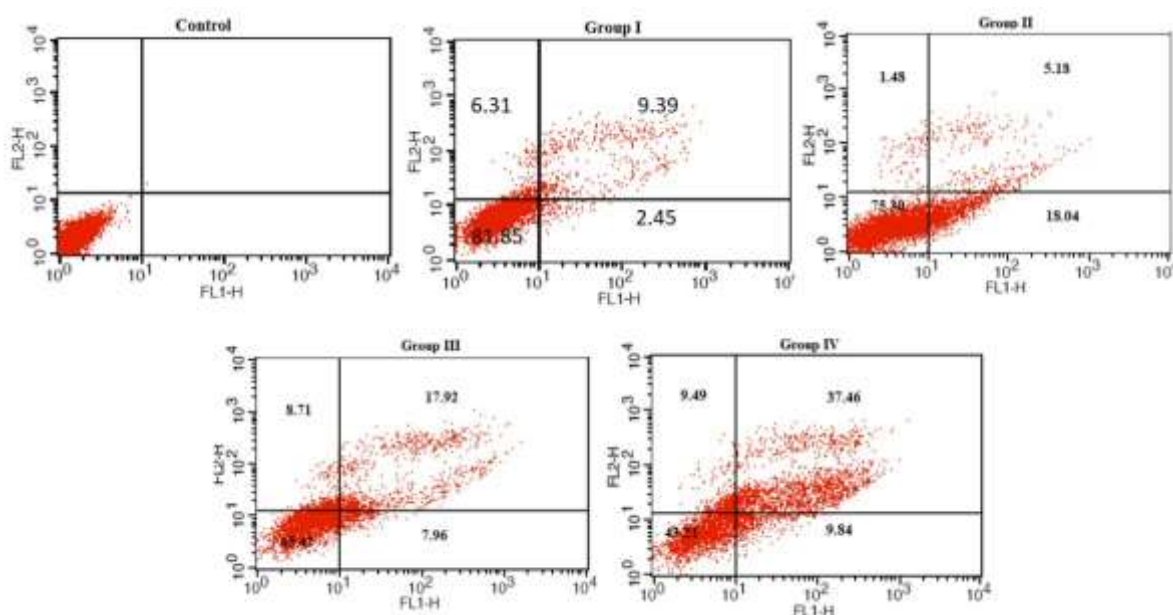
شکل ۵. تأثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر میزان توان زیستی رده سلولی PC-3 در مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون. (*= $P<0/01$), اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل)



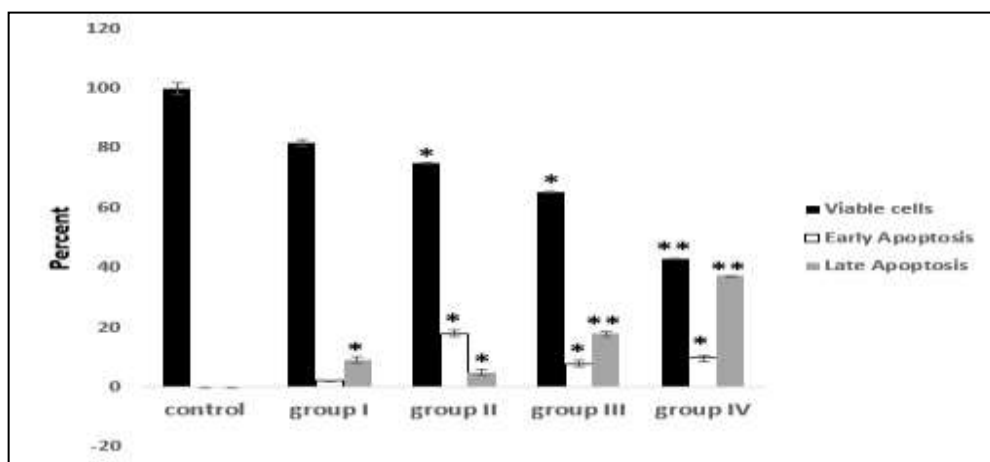
شکل ۶. تأثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر میزان توان زیستی رده سلولی PC-3 در مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون (*= $P<0/01$), اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل, **= $P<0/001$, اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل)

همان طور که در شکل های ۷، ۹ و ۱۱ دیده می شود، درصد سلول های زنده در سایر گروه ها در هر سه زمان انکوباسیون نسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می دهد که این اختلاف از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی دار است ($P < 0.05$). همچنین درصد سلول هایی که در مرحله ابتدایی و انتهایی آپوپتوزیس هستند با افزایش غلظت سوپرناتانت و طول زمان انکوباسیون افزایش یافته اند، که این افزایش درصد آپوپتوزیس نیز نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی دار است (شکل های ۸، ۱۰، ۱۲).

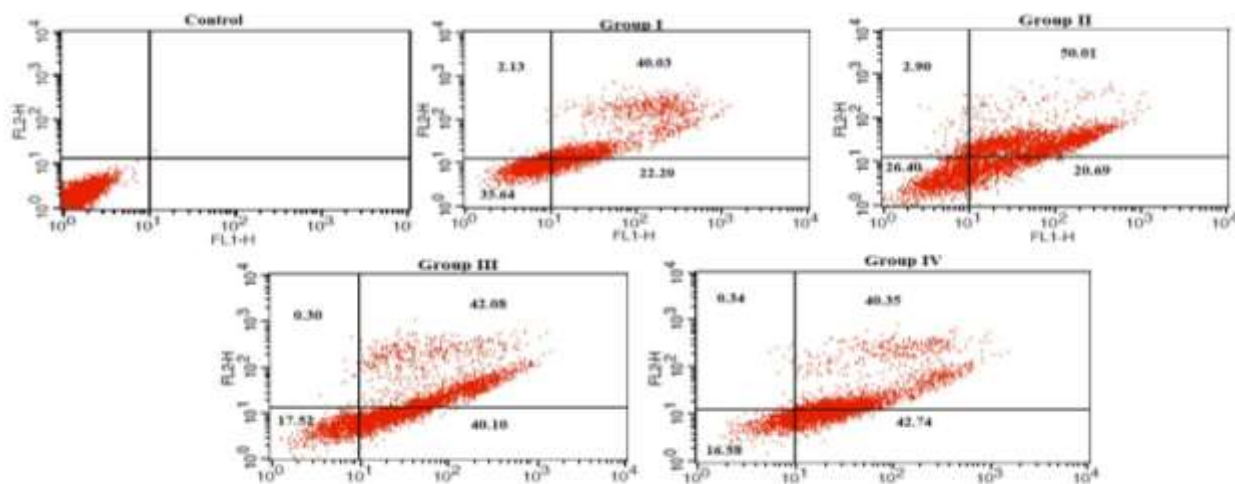
برای بررسی میزان آپوپتوزیس از تست آنکسین V-FITC استفاده شد. سلول ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت غلظت های مختلف سوپرناتانت قرار گرفتند و تاثیر غلظت های مختلف سوپرناتانت در رده سلولی PC-3 بر میزان آپوپتوزیس پس از تیمار اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این تست خبر از افزایش درصد مرگ سلولی در گروه های آزمایشی تحت تیمار می دهد. به طوری که با افزایش دوز و طول زمان تیمار درصد سلول های زنده در گروه های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است.



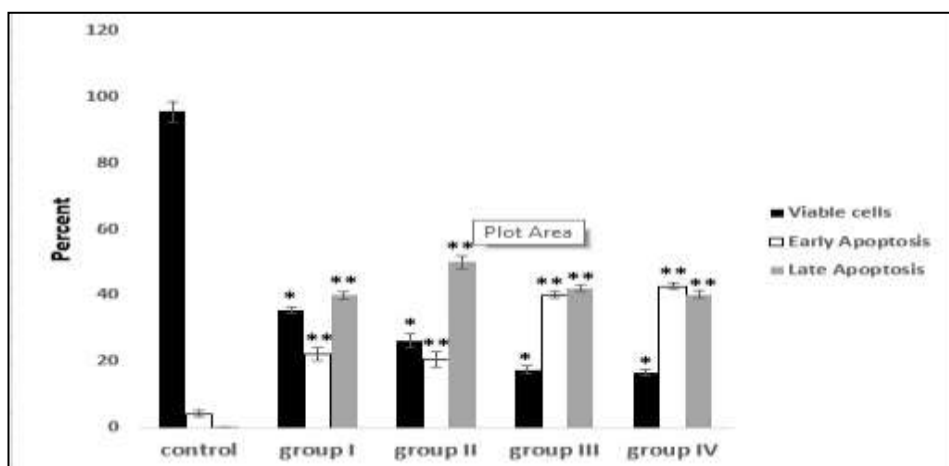
شکل ۷. تاثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر آپوپتوزیس سلول های PC-3. سلول های PC-3 با ۲۰-۵ میلی گرم/میلی لیتر از سوپرناتانت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.



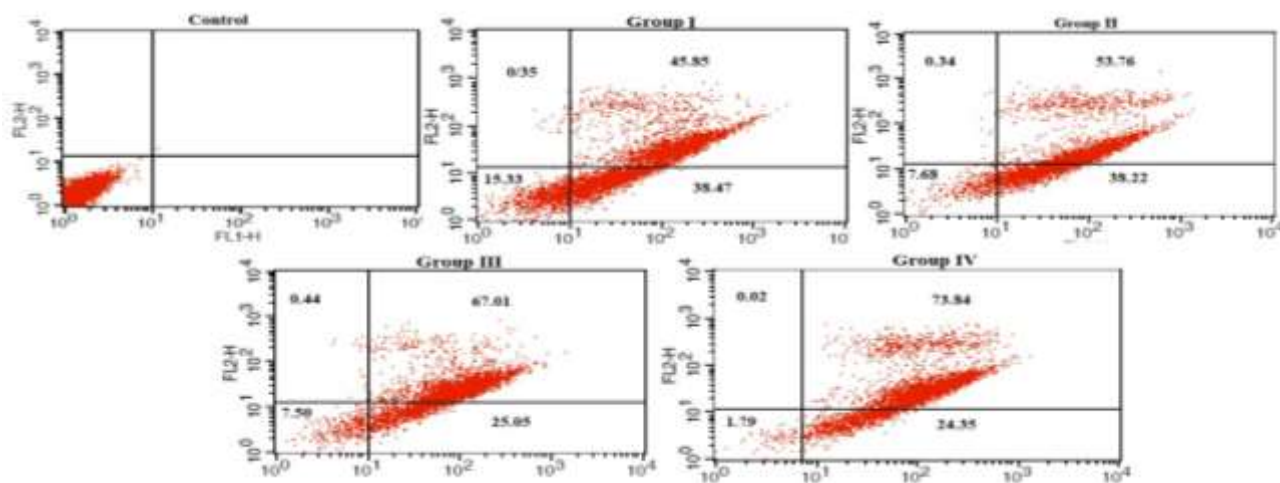
شکل ۸. درصد سلول های زنده، آپوپتوزیس اولیه و آپوپتوزیس انتهایی در سلول های PC-3 تحت تیمار با غلظت های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* به مدت ۲۴ ساعت. ($P < 0.05$); ($P < 0.01$) ** در مقابل گروه کنترل.



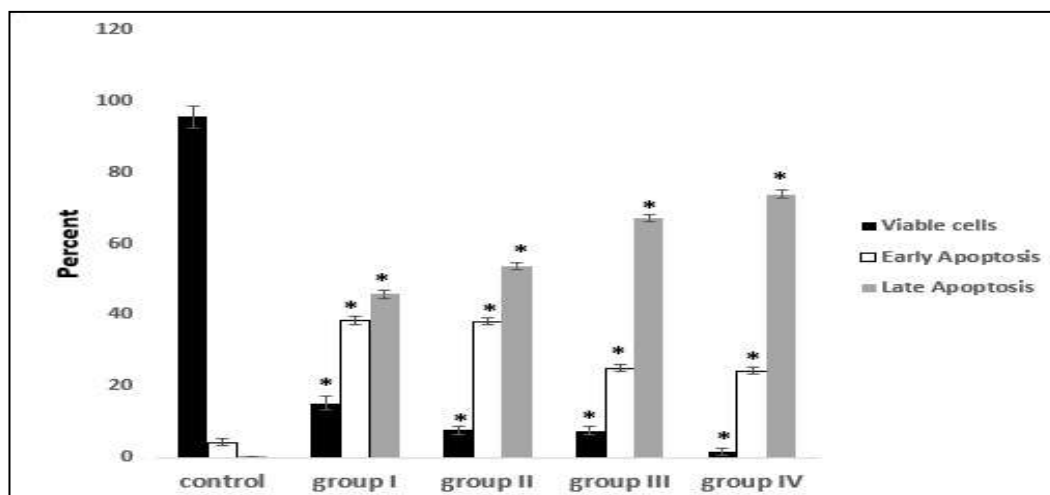
شکل ۹. تاثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر آپپتوزیس سلول‌های PC-3. سلول‌های PC-3 با ۵-۲۰ میلی گرم/میلی لیتر از سوپرناتانت به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.



شکل ۱۰. درصد سلول‌های زنده، آپپتوزیس اولیه و آپپتوزیس انتهایی در سلول‌های PC-3 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* به مدت ۴۸ ساعت ($P < 0.01$); ($P < 0.001$) در مقابل گروه کنترل.



شکل ۱۱. تاثیر سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* بر آپپتوزیس سلول‌های PC-3. سلول‌های PC-3 با ۵-۲۰ میلی گرم/میلی لیتر از سوپرناتانت به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند.



شکل ۱۲. درصد سلول‌های زنده، آپوپتوزیس اولیه و آپوپتوزیس انتهایی در سلول‌های PC-3 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* به مدت ۷۲ ساعت. ($P < 0.001$) * در مقابل گروه کنترل.

بحث

که این کاهش توان زیستی در گروه III و IV نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین در تیمار ۴۸ ساعته همه گروه‌ها به جز گروه اول نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.01$) و در نهایت سلول‌هایی که به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار غلظت‌های مختلف سوپرناتانت قرار گرفته بودند، در همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش وابسته به دوز نشان دادند که این اختلاف در تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.001$).

Phonnok و همکاران در سال ۲۰۱۰، به بررسی متابولیت‌های میکروبیال و نقش آن‌ها در القای آپوپتوزیس و بررسی آن بر روی سلول‌های سرطانی پرداختند و تأثیر ۳۹۴ عصاره میکروبی را بر فعالیت تکثیری ۴ رده از سلول‌های سرطانی با استفاده از روش MTT ارزیابی کردند. نتیجه اینکه در اثر این عصاره‌ها تغییرات مورفولوژیک سلول مانند چروک خوردن سلول، از دست دادن تماس سطحی و از دست دادن تورم سلولی در تمام سلول‌های سرطانی تیمار شده مشاهده شده است (۱۵)، که می‌تواند تأییدی بر نتیجه مطالعه حاضر باشد. به این صورت که توان زیستی سلول‌ها وقتی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف سوپرناتانت قرار گرفتند، نسبت به گروه کنترل کاهش وابسته به غلظت نشان دادند.

Tuo و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر ضدتکثیری ۷ سویه لاکتوباسیلوس وحشی جدا شده از تخمیر مواد غذایی را بر روی رده سلولی HT-29 جدا شده از مدل‌های آزمایشگاهی را بررسی کردند. نتایج حاکی از این بود که فعالیت ضدتکثیری روی سلول‌های HT-

با توجه به گسترش سرطان به عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل مرگ و میر انسانی، مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و مضرات عدیده و گاه انکوژنیک این دسته از داروها، نیاز برای کشف ترکیبات جدید و ایجاد استقلال و عدم وابستگی به کشورهای بیگانه در زمینه تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطانی حس می‌شود. از سوی دیگر، با توجه به اینکه مطالعات نادری در زمینه تولید ترکیبات ضدتوموری از باکتری‌های بومی ایران صورت گرفته است، نیاز به شناسایی سویه‌های جدید بومی تولیدکننده ترکیبات جدید احساس می‌شود. همچنین توانایی تولید موادی با فعالیت ضد میکروبی، نه تنها به عنوان یک ابزار دفاعی است، بلکه از نقطه نظر دارویی و با توجه به اثرات جانبی و مقاومت میکروارگانیسم‌های پاتوژن علیه آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند به طور موثری در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد. لذا این مطالعه به بررسی اثرات ضد سرطانی ترکیبات تولیدی *Bacillus licheniformis* علیه رده سلولی سرطان پروستات (PC-3) با روش‌های سنجش سیتوتوکسیسیته پرداخته است. در این پژوهش *Bacillus licheniformis* به عنوان بهترین جدایه از لحاظ تولید ترکیبات ضد میکروبی با طیف اثر گسترده برای بررسی فعالیت ضد سرطانی نیز مورد استفاده قرار گرفت و نحوه تأثیر ترکیبات تولیدی آن بر میزان توان زیستی در رده سلول PC-3 بررسی شد. رده سلولی PC-3 در ۴ گروه توسط سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* تیمار گردید. نتایج تست MTS با انکوباسیون ۲۴ ساعته سلول‌ها با تیمار نشان داد که میزان توان زیستی به صورت وابسته به دوز است، به طوری که با افزایش غلظت، میزان توان زیستی نیز نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد،

29 را فقط سویه لاکتوباسیلوس کورینه فرمیس داشت و توانست رشد سلول‌های HT-29 را مهار کند (۱۹). که در مطالعه حاضر نیز غلظت‌های مختلف سوپرناتانت *Bacillus licheniformis*، توانست رشد رده سلولی PC-3 را مهار کند.

Moosavi و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثر متابولیت‌های ثانویه/ستریتومایسس sp. ABR11NW بر روی آپوپتوزیس رده سلولی K562 پرداختند. در مطالعه آن‌ها رده سلولی K562 با غلظت‌های مختلف متابولیت‌های محلول در اتر و برای مدت زمان ۱۲ تا ۷۲ ساعت تیمار شدند و از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و آزمون قطعه قطعه شدن DNA به ترتیب برای بررسی مهار رشد و وقوع آپوپتوزیس استفاده شد. داده‌ها نشان داد که متابولیت‌های محلول در اتر باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان بر رده سلولی K562 بود (۲۰). مطالعه حاضر از نظر بررسی اثر ترکیبات تولیدی بر رده سلولی سرطانی و نیز روش بررسی آپوپتوزیس نتایجی مشابه با مطالعه Moosavi را ارائه نموده است علاوه بر این که از کیت آنکسین و روش فلوسایتومتری در مطالعه حاضر استفاده شده است.

Parsaseresht و همکاران در تحقیقی در سال ۲۰۱۳ به بررسی تأثیر متابولیت‌های ثانویه لاکتوباسیلوس/امنوسوس GG روی رده سلول سرطانی CacoII پرداختند و نشان دادند که به‌طور میانگین متابولیت‌های لاکتوباسیلوس/امنوسوس GG در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بترتیب ۶۰/۸، ۷۲/۵ و ۸۲/۱ درصد رشد سلول‌های سرطانی CacoII را مهار کردند (۱۶). این یافته‌ها در راستای یافته‌های مطالعه حاضر در زمینه اثرات ضد سرطانی ترکیبات تولیدی میکروبی بوده است.

Mahmoudi Aslzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم را روی سلول‌های سرطانی cacoII (رده سلولی سرطان روده بزرگ) بررسی کردند. برای این کار غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت‌ها روی سلول‌های سرطانی cacoII کشت شده در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اثر داده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که درصد مهار سوپرناتانت بیفیدوباکتریوم روی سلول‌های سرطانی ۵۵ درصد تا ۸۲ درصد بوده که مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرولیتر ۲۴ ساعته و ۳۰۰ میکرولیتر ۷۲ ساعت بوده است (۲۱). در این مطالعه نیز از سوپرناتانت باکتری انتخابی استفاده و نتایج مشابهی گرفته شد.

Vijaya Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۴، اثر متابولیت‌های باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس پوپیلوس را که از نمونه‌های آلوده در ناحیه شیموگا، کارناتاکی هند ایزوله شده بودند،

برای بررسی خواص ضدسرطانی و سلول‌کشی از اجزای مختلف عصاره‌های به‌دست آمده از متابولیت‌های این دو باکتری بر روی سلول‌های نرمال کبد انسانی و ۲ نوع سلول سرطانی استفاده کردند، که نتایج بررسی‌ها حاکی از این است که هر دو نمونه فعالیت قابل توجهی داشتند. اما نمونه‌ای که از باسیلوس سرئوس گرفته شده بود اثر سلول‌کشی بالایی را نشان داد، ولیکن متابولیت‌های باسیلوس پوپیلوس اثر سمی روی سلول‌های سرطانی و نرمال داشتند (۲۲). این نتایج مشابه با تحقیق انجام شده بوده با این تفاوت که در مطالعه حاضر هیچ اثر سمی روی سلول‌های نرمال مشاهده نگردید.

Vazquez-Rivera و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مکزیک، تأثیر سمیت سلولی چرخه دی‌پپتیدها از سودوموناس/آروژینوزا PAOI را در آپوپتوزیس رده‌های سلولی سرطانی انسان مورد بررسی قرار دادند. مشاهده شد که این ترکیبات می‌توانند ۵۰ درصد اثر مهاری داشته باشند (۲۳)، که این نتایج تأییدی بر نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر است.

Pasiar و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای به بررسی مهار انتخابی رشد رده سلولی آدنوکارسینوما پستان با استفاده از متابولیت‌های تولیدی سویه بومی سودوموناس sp. UW4 در آزمایشگاه پرداختند. طی این مطالعه فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی سویه بومی سودوموناس sp. UW4 علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زا بررسی شد. برای بررسی فعالیت ضدسرطانی، سلول‌های SKBR3 و HU-02 با غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که سودوموناس sp. UW4، قادر به تولید متابولیت‌های ضد میکروبی علیه/استافیلوکوکوس/اورئوس است. تیمار با متابولیت نشان داد با افزایش غلظت به‌صورت وابسته به دوز و زمان، توان زیستی سلول‌ها کاهش پیدا کرد. به‌طوری‌که بیشترین تأثیر مربوط به غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها بود. در حالی که متابولیت‌ها در غلظت‌های مختلف تأثیر معناداری بر سلول‌های فیبروبلاست نرمال نداشت (۱۸) که این نتایج تأییدی بر مطالعه حاضر است.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی خاصیت ضد توموری باکتری رودوکوکوس Lut0910 جداسازی شده از خاک آلوده پرداختند. اثرات آن متابولیت‌ها روی دو رده سلول سرطانی کبدی (HepG2) و سرطان رحم (Hela) مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول‌های سرطانی مورد مطالعه با عصاره استخراج‌شده از

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از بررسی تست MTS و آنکسین نشان داد که میزان آپوتوزیس در رده سلولی PC-3 با افزایش غلظت سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* به میزان قابل توجهی افزایش می یابد. لذا با توجه به اینکه تکثیر سلولی و آپوتوزیس نامنظم یکی از مشخصه های سرطان است بنابراین می توان از سوپرناتانت *Bacillus licheniformis* برای کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوتوزیس در پیش گیری و درمان سرطان پروستات استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از تمام کسانی که در طول انجام این پژوهش همکاری کردند، اعلام می نمایم. شایان ذکر است این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکترای آقای احمدرضا شهنیانی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون می باشد و هزینه های مالی این تحقیق به عهده محققین بوده است.

تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته اند.

منابع مالی

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است.

Referance

- Zhang XG, Liu ZY, Liu JW, Zeng YL, Guo GJ, Sun QY. Antitumor activity of a *Rhodococcus* sp. Lut0910 isolated from polluted soil. *Tumor Biol.* 2017; 39 (6): 1-9. [DOI:10.1177/1010428317711661] [PMID]
- Baserisalehi M, Bahador N. Evaluation of soil origin *Pseudomonas* sp. for production of bioactive compounds. *J Biol Sci.* 2013; 13 (3): 152-7. [DOI:10.4414/pc-d.2013.00352]
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001; 71 (1): 1-20. [DOI:10.1016/S0168-1605(01)00560-8]
- Deutsch E, Maggiorella L, Eschwege P, Bourhis J, Soria JC, Abdulkarim B. Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *Lancet Oncol.* 2004; 5 (5): 303-3. [DOI:10.1016/S1470-2045(04)01468-8]
- Muehlenbein MP, Bribiescas RG. Testosterone mediated immune functions and male life histories. *Am J Hum Biol.* 2005; 17: 527-58. [DOI:10.1002/ajhb.20419] [PMID]
- Wein A, Kavoussi L, Partin A, Craig P. Campbell-walsh Urology. 11th ed. Elsevier; 2015.
- Wilkinson AN, Brundage MD, Siemens R. Approach to primary care follow-up of patients with prostate cancer. *Can Fam Physician.* 2008; 54 (2): 204-10.
- Jewett MA, Fleshner N, Klotz LH, Nam RK, Trachtenberg J. Radical prostatectomy as treatment for prostate cancer. *CMAJ.* 2003; 168 (1): 44-5.
- Fleshner N, Al Azab R. Prostate cancer: chemoprevention update 2005. *Can J Urol.* 2005; 12 (2): 2-4.
- Pollack A, Zagars GK, Smith LG, Lee JJ, Von Eschenbach AC, Antolak JA, et al. Preliminary results of a randomized radiotherapy dose-escalation study comparing 70 Gy with 78 Gy for prostate cancer. *J Clin*

- Oncol. 2000; 18 (23): 3904-11. [DOI:10.1200/JCO.2000.18.23.3904] [PMID]
11. Bamzadeh Z, Baserisalehi M, Bahador N, Hejazi H. Screening of soil Streptomyces and characterization of their bioactive compounds. J Health Med. 2013; 7 (8): 2293-00.
12. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot. 2009; 62 (1): 5-16. [DOI:10.1038/ja.2008.16] [PMID] [PMCID]
13. Ibarguren C, Audisio MC, Torres EM, Apella MC. Silicates characterization as potential bacteriocin-carriers. Innov Food Sci Emerg. 2010; 11 (1): 197-02. [DOI:10.1016/j.ifset.2009.10.002]
14. Pourhavareshi 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): 399-09.
15. Phonnok S, Tanechpongthamb WU, Wangsatayanon BT. Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites. J Biotechnol. 2010; 13 (5): 1-12. [DOI:10.2225/vol13-issue5-fulltext-7]
16. Parsaseresht L, Fazeli M, Samadi N, Jamalifar H, EIDI A, Mahmudiaslzadeh H. Effect of metabolites produced by Lactobacillus Rhamnosus GG (probiotic bacteria) on the growth of human colon cancer cell line CacoII. Iran J Biol. 2013; 25 (4): 484-92.
17. Bamzadeh Z, Baserisalehi M, Bahador N, Hejazi H. Isolation and identification of antimicrobial producing Actinomycetes from Shiraz soil farms. J Microbial. 2012; 4 (16): 7-19.
18. Pasiar M, Rouhi L, Bamzadeh Z, Hejazi H. In vitro selective growth inhibition of breast adenocarcinoma cell lines by Pseudomonas sp. UW4 metabolites. TUMJ. 2016; 74 (9): 614-20.
19. Tuo YF, Zhang LW, Yi HX, Zhang YC, Zhang WQ, Han X, et al. Short communication: Antiproliferative effect of wild Lactobacillus strains isolated from fermented foods on HT-29 cells. J Dairy Sci. 2010; 93: 2362-6. [DOI:10.3168/jds.2010-3069] [PMID]
20. Moosavi MA, Ghanbarvand F, Dehnad AR. Growth inhibition and induction of apoptosis by ether soluble metabolites of Streptomyces sp. ABRIINW 111 in Human Myeloid Leukemia K562 cell line. Cell Tissue Res. 2011; 2(3): 225-34.
21. Mahmoudi Aslzadeh H, Fazeli M, Eaidi A, Samadi N, Jamalifar H, Parsaseresht L. Study of probiotic effect of Bifidobacterium bifidum on CacoII cancer cell line. Iran J Biol. 2013; 26(3): 378-85.
22. Vijaya Kumar ML, Thippeswamy B, Vasanth Raj P. Cytotoxicity and anticancer studies of Bacillus cereus and Bacillus pumilus metabolites targeting human cancer cells. Appl Biochem Microbial. 2014; 50: 619-23. [DOI:10.1134/S0003683814060088]
23. Vazquez-Rivera D, Gonzalez O, Guzmán-Rodríguez J, Diaz-Perez AL, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Bucio J, et al. Cytotoxicity of cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. Biomed Res Int. 2015; 2015: 1-9. [DOI:10.1155/2015/197608] [PMID] [PMCID]
24. Dehnad AR, Abushov R, Hamed J, Nahaei MR, Mobaiyen H, Zendehdel A. Study of active secondary metabolites of Streptomyces levis isolated from north west soils of Iran and their in vitro and in vivo antibacterial effects. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv. 2017; 39(3): 39-46.