

Original Article

The Study of *NF- κ B* and *MAPK* Genes Expression in HT29 Colon Cancer Cell line Co-Cultured with *Streptococcus thermophilus*

Mahdiyeh Behrouz Sarand¹ , Changiz Ahmadizadeh^{2*} 

¹Department of Biology, Islamic Azad University, Bonab Branch, Bonab, Iran

²Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran

*Corresponding author; E-mail: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

Received: 27 February 2018 Accepted: 3 May 2018 First Published online: 19 Dec 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 February- March; 41(6):15-24

Abstract

Background: Probiotics are normal flora bacteria. So far, various mechanisms have been identified for the effects of probiotics such as stimulating the immune system, modulating the composition of the normal flora of the digestive, urinary and genital tract, and preventing the activity of fecal carcinogenic enzymes. Due to the high concentration of normal flora in the intestine and the nature of the most sporadic colorectal cancers, this cancer is among the main candidates for treatment with probiotics. In this study, the expression of *NF- κ B* and *MAPK* genes were investigated in HT29 colon cancer cells which co-cultured with *Streptococcus thermophilus*.

Methods: Supernatant and bacterial extract were prepared from bacterial culture, and the cells were treated with these agents. Following, the effects of cytotoxicity of the bacterial cell extract on the HT29 cell line during 24 hours were investigated using MTT method. Also, the expression of *NF- κ B* and *MAPK* genes in HT29 cell line was investigated using Real Time PCR. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Results: The results of MTT test showed that concentration of bacteria with OD= 0.05 had the highest killing power in 4 hours. *Streptococcus thermophilus* increases the expression of *MAPK* genes and significantly reduces the expression of *NF- κ B* genes and causes apoptosis in cancer cells.

Conclusion: The results of this study showed that *Streptococcus thermophilus* can be used to create a novel therapeutic treatment with high impact, low side effects, bioavailability and cost reduction, or as a suitable side therapy.

Keyword: *NF- κ B*, *MAPK*, Co-culturing, *Streptococcus thermophilus*, Colon Cancer HT29

How to cite this article: Behrouz Sarand M, Ahmadizadeh Ch. [The Study of *NF- κ B* and *MAPK* Genes Expression in HT29 Colon Cancer Cell line Co-Cultured with *Streptococcus thermophilus*]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 February- March; 41(6):15-24. Persian.

مقاله پژوهشی

مطالعه میزان بیان NF- κ B و MAPK در کشت همجوار باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس با سلول‌های سرطانی کولون HT29

مهديه بهروز سرند^۱، چنگیز احمدی‌زاده^{۲*}

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب، بناب، ایران
^۲گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
* نویسنده مسؤل؛ ایمیل: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۸ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۹/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. بهمن و اسفند ۱۳۹۸؛ ۴۱(۶): ۲۴-۱۵

چکیده

زمینه: پروبیوتیک‌ها باکتری‌های فلور نرمال هستند. تاکنون مکانیسم‌های مختلفی مثل تحریک سیستم ایمنی، تعدیل ترکیب جمعیت فلور نرمال دستگاه گوارشی، ادراری و تناسلی و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های سرطان‌زای مدفوعی برای اثرات پروبیوتیک‌ها شناسایی شده است. با توجه به تراکم بالای فلور نرمال در روده و ماهیت اکثر آنتی‌جیر سرطان‌های کولورکتال، این سرطان‌ها جزو کاندیدهای اصلی درمان با پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند. در این مطالعه میزان بیان ژن‌های NF- κ B و MAPK در کشت همجوار باکتری *Streptococcus thermophilus* با سلول‌های سرطانی کولون HT29 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: از کشت باکتری‌ها، مایع رویی و عصاره باکتریایی تهیه شده و سلول‌ها توسط این مواد تیمار شدند. در ادامه اثرات سمیت سلولی عصاره سلول باکتری روی رده سلولی HT29 در مدت زمان ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT بررسی شد. همچنین میزان بیان ژن‌های NF- κ B و MAPK در رده سلولی HT29 با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه داده‌ها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شد. **یافته‌ها:** نتیجه آزمایش MTT نشان داده شده است که غلظت OD = ۰/۰۵ بیشترین کشندگی در ۴ ساعت را دارد. باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس میزان بیان ژن‌های NF- κ B را به شدت کاهش و بیان MAPK را افزایش می‌دهد و باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. **نتیجه‌گیری:** نتیجه‌گیری که از این تحقیق بدست آمد نشان داد که از باکتری‌های استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌توان جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی‌خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: MAPK، NF- κ B، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، کشت همجوار، سرطان

نحوه استناد به این مقاله: بهروز سرند م، احمدی‌زاده چ. مطالعه میزان بیان NF- κ B و MAPK در کشت همجوار باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس با سلول‌های سرطانی کولون HT29. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۶): ۲۴-۱۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان روده بزرگ چهارمین سرطان شایع در ایران است و برآورد شده که سالانه حدود ۳۸۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد جدید از سرطان روده بزرگ در کشور تشخیص داده می‌شود (۱). سرطان روده بزرگ و راست روده سرطانی است که در مراحل ابتدایی از طریق غربالگری قابل پیشگیری و قابل درمان است. اغلب، سرطان روده بزرگ از رشد پولیپ‌های کوچکی در روده بزرگ که آدنوم نامیده می‌شوند، توسعه می‌یابد. باکتری‌های موجود در مجاری گوارشی بی‌ضرر و برای سلامتی انسان مفید هستند. اگرچه تعدادی از فلورهای میکروبی مضر در مجاری گوارشی می‌توانند در وقوع سرطان‌های گوارشی نقش داشته باشند. سرطان‌های گوارشی اغلب کولون را درگیر می‌کنند (۲). سرطان کولون از مهم‌ترین سرطان‌ها در سراسر دنیا محسوب می‌شود (۳) و سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد (۴). میزان بروز این سرطان در نقاط مختلف جهان به شدت متفاوت است (۵). در بسیاری از کشورهای آسیایی به ویژه کشورهای توسعه‌یافته و غربی، میزان بروز سرطان کولون مانند کشورهای توسعه یافته بالاست (۶). طبق گزارش مرکز ثبت سرطان ایران، سرطان کولون چهارمین علت سرطان پس از سرطان پوست، پستان و دستگاه گوارش می‌باشد (۷). میزان شیوع سرطان کولورکتال در ایران؛ در کل جمعیت ۱۹/۶۶ در هر صد هزار نفر و میزان شیوع در مردان ۲۰/۴۸ و در زنان ۱۸/۸۲ در هر صد هزار نفر از جمعیت است (۸). منشا اصلی سرطان‌های گوارشی به خوبی شناخته نشده است اما چند عامل شناسایی شده‌اند که با شیوع این سرطان‌ها ارتباط مستقیم دارد. سرطان‌زایی و جهش‌زایی با تغییرات مخاط طبیعی اولیه به آدنوما (تومور خوش‌خیم با منشا بافت غددی) و کارسینومای تهاجمی (رشد بدخیم سلول‌های اپیتلیال) مشخص می‌شود (۲). سرطان کولورکتال سومین سرطان تشخیص داده شده در بین مردان و زنان بوده که حدود ۷۵٪ از بیماران فرم‌های پراکنده‌ای از این بیماری را داشته‌اند و ۲۵٪ باقیمانده از بیماران دارای سابقه فامیلی از بیماری بوده که بیان کننده ژن‌های مشترک و محیط می‌باشد؛ اگرچه ۵٪-۶٪ از CRC (colorectal cancer) منجر به جهش‌های وراثتی در ژن‌های بزرگ می‌شود، باقی‌مانده فرم‌های خانوادگی از تداخل بین ژن‌های وراثتی و فاکتورها یا عامل‌های محیطی می‌باشد (۹). مطالعات نشان داده که بستگان درجه اول فرد مبتلا که پس از سن ۵۰ سال تشخیص داده شده‌اند دو تا سه برابر بیشتر در خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ قرار دارند. علاوه بر این افراد دارای بیش از یک فامیل دچار سرطان یا ابتلای اولین فرد از بستگان در سن زیر ۴۵ سال، سه تا شش برابر

بیشتر در خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ قرار دارند. از عوامل خطر دیگر CRC شامل حضور پولیپ‌های دنداندار بزرگ (آدنوم‌های دنداندار و پولیپ هیپرپالستیک)، رژیم غذایی غنی از چربی‌ها و گوشت، سیگار کشیدن، استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی، مصرف الکل، بی‌حرکتی، BMI (Body Mass Index) و چاقی شکمی است. مصرف زیاد فولات، ویتامین‌ها و فیبر رژیم غذایی، کولونوسکوپی با حذف پولیپ‌های آدنوماتوز و استفاده از هورمون پس از یائسگی با کاهش خطر همراه است (۹). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند. CRC که در صورت مصرف در انسان یا حیوان و با اثر بر فلور میکروبی بدن، باعث بروز اثرات مفیدی بر سلامتی می‌شوند. بیشتر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان می‌باشند و در آنجا زندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند. معمول‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی به دو گروه باکتری‌ها و قارچ‌ها تقسیم می‌شوند. بعضی از این میکروارگانیسم‌ها سویه‌های انتخابی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم هستند؛ گرچه گونه‌هایی از انتروکوکوس، استرپتوکوکوس و اشرشیاکلائی نیز برای این منظور استفاده می‌شوند. از مخمرها نیز ساکارومیسس سروریزیبه (*Saccharomyces cerevisiae*)، ساکارومیسس بولاردی (*saccharomycesboulardii*) و... را می‌توان به عنوان پروبیوتیک نام برد. بیشتر باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم بی‌خطر تشخیص داده شده‌اند و به جز استرپتوکوکوس و انتروکوکوس، سایر باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک به ندرت برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و کاربرد آن‌ها از دیرباز در تهیه محصولات غذایی بدون ایجاد اثرات سوء به اثبات رسیده است. استرپتوکوکوس ترموفیلوس (*Streptococcus thermophiles*) با تولید باکتریوسین و ترموفیلین مانع از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شود، به طوری که مصرف روزانه فرآورده‌های پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس بیماری‌زایی به میزان ۱۹ درصد در افراد کاهش می‌یابد. زخم‌های روده در پستانداران اغلب به عنوان منشا پیش‌نئوپلاستی در نظر گرفته می‌شوند. ACF (Aberrant Crypt Foci) یکی از زخم‌های پیش‌نئوپلازی است و به طور کلی شامل حفره‌های بزرگ و ضخیم می‌باشد. حفره نابجا ممکن است به تنهایی یا به شکل گروهی از حفره‌های نابجای متمرکز ظاهر شوند و این حفره‌ها به سمت پولیپ (توده‌های کوچکی است که در روده بزرگ یا راست روده ظاهر می‌شود) و در نهایت تومور پیشرفت می‌کنند. تجویز خوراکی باکتری‌های اسیدلاکتیک

سلول‌های بی‌ثبات از نظر ژنومیک از طریق آپوپتوز یک فرایند تنظیمی مهم در برابر سرطانی شدن سلول‌ها است. همان گروه از دانشمندان گزارش کرده‌اند که ترکیب RS و *B. lactis* به‌طور چشمگیری سلول‌ها را در برابر تصویرگیری سرطان کلورکتال در مدل *rat-azoxymethane* حفاظت می‌نماید (۱۸). تعدادی از سویه‌های پروبیوتیک گزارش شده‌اند که سرطان‌های خونی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. *Lactobacillus reuteri* آپوپتوز القاء شده توسط TNF (Tumor necrosis factor) در سلول‌های مشتق از لوسمی میلونید مزمن انسانی را که از طریق تعدیل پیام‌رسانی MAPK (MAPK-mitogen-activated protein kinase) و NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) و کاهش پروتئین‌هایی که تکثیر سلولی یا مهار آپوپتوز (*Bcl-2*, *Bcl-xL*) را میانجیگری می‌کنند، افزایش می‌دهد (۱۹). Chiu نشان داده است که فاکتورهای محلول باکتریایی (LcrS) ترشح شده توسط *Lactobacillus casei rhamnosus* آپوپتوز رده سلولی لوسمی مونوسیتانسانی (THP-1) را القاء می‌کند (۲۰). بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان NF- κ B و MAPK در کشت همجوار باکتری *Thermophilus Streptococcus* با سلول‌های سرطانی کولون HT29 است.

روش کار

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات ریز فناوری دارویی علوم پزشکی تبریز، در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی HT29 از بانک سلولی پاستور تهیه و باکتری از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. سلول‌ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (penicillin 0.1 μ g/ μ L and streptomycin 0.1 μ g/ μ L) در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شدند. بعد از یک شبانه‌روز، محیط کشت سلول‌ها دور ریخته شد و محیط با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده و محیط کشت تازه به آن افزوده و دوباره در انکوباتور قرار گرفته، بعد از ۴۸ ساعت سلول‌ها پاساژ داده شدند به این تصویر که درون هود لامینار محیط کشت تخلیه و با PBS خوب شستشو داده شد و سپس با تریپسین X۱ اقدام به جداسازی سلول‌ها از دیواره فلاسک شد. جهت عملکرد مناسب تریپسین بهتر است فلاسک کشت سلولی حاوی تریپسین به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. در صورت جدا شدن اکثر سلول‌ها فوراً فلاسک به زیر هود منتقل شد و با محیط کشت تازه رقیق شد. بنابراین با محیط کشت، تریپسین خنثی نموده و با پیپت به آرامی تنظیم شد تا سوسپانسیون

(بیفیدو باکتری‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها) می‌تواند از پیدایش زخم‌های پیش‌نئوپلازی ذکر شده پیشگیری کند. بر طبق تعریف رایج و مورد قبول سازمان بهداشت جهانی و سازمان غذا و کشاورزی آمریکا، پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی به بدن برسند، دارای خواص سلامت‌بخشی برای میزبان خود هستند. همچنین در زمینه درمان بیماری التهاب روده‌ای توسط پروبیوتیک‌ها نتایج امیدبخشی حاصل شده است. علاوه بر تنظیم هموستازی اپیتلیال روده و پاسخ‌های ایمنی، برخی پروبیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده‌اند که مکانیسم‌های ضدسرطانی را فعال می‌کنند (۱۰). Altosy و همکاران القاء مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در سلول‌های کارسینومای کولونی انسان با استفاده از پروبیوتیک‌های مثل *Lactobacillus rhamnosus*، *Bifidobacterium lactis*، را گزارش داده‌اند (۱۱). نتایج بدست آمده توسط Baldwin و همکاران نشان می‌دهد که *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* قادرند توان القایی آپوپتوز ۵-فلوروئوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال LS513 افزایش دهند، بنابراین پیشنهاد شده است که از این پروبیوتیک‌ها به عنوان ادجوانت در شیمی‌درمانی ممکن است استفاده شود (۱۲). اما هنوز روشن نیست که آیا پروبیوتیک‌ها توانایی مشابه در تحت تاثیر قرار دادن آپوپتوز در سلول‌های کولون نرمال انسانی را دارند *Propionibacterium freudenreichii* مرگ سلولی را در رده‌های سلول‌های سرطانی معده و کولون انسانی، از طرق ترشح اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در محیط کشت القاء می‌کند (۱۳). همچنین این پروبیوتیک فعالیت سیتوتوکسیتی داروی camptothecin در زمینه شیمی‌درمانی سرطان معده را افزایش داده است و یا ممکن است از آن به عنوان پروبیوتیک تخمیر کننده شیر برای جلوگیری از سرطان معده بهره جست (۱۴). در مطالعه دیگری گزارش شده است که EPS (exopolysaccharides) پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* در مرگ سلول‌های سرطانی کولون از طریق اتوفاژی درگیرند (۱۵). پیشنهاد شده است که سمیوتیک واقع مخلوطی از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک (محصول تخمیری میکروب‌ها) ممکن است بسیار موثرتر از تنها پروبیوتیک و یا تنها پری‌بیوتیک در پیشگیری از سرطان‌های کلورکتال باشد (۱۶). نشان داده شده است که ترکیبی از پروبیوتیک (resistant starch, RS) و *Bifidobacterium lactis* به‌طور چشمگیری پاسخ آپوپتوتیک به یک کارسینوژن genotoxic را در distal colon موش‌های صحرائی در یک بازه زمانی کوتاه بعد از مواجهه با کارسینوژن تسهیل می‌نماید. این تأثیر با استفاده از RS ترکیب شده با *L. acidophilus* مشاهده نشده است (۱۷). مرگ

برابر است با 8×10^9 سلول در هر میلی‌لیتر است. این میزان برای OD2 برابر است با $1/6 \times 10^9$ سلول در هر میلی‌لیتر، برای OD1.5 برابر است با $1/2 \times 10^9$ سلول در هر میلی‌لیتر و برای OD.5 می‌شود 4×10^8 سلول در هر میلی‌لیتر. پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک‌ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شده در PBS) جایگزین می‌شود. سلول تیمار نشده با باکتری به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون (گلايسين ۰/۱ M، NaCl ۰/۱ M، دارای pH ۱0.5 بهینه شده با NaOH ۱) جایگزین گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک (shake) گردیدند. سرانجام تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. زیست‌پذیری

نمونه‌ها A570

سلولی نسبی به صورت $100 \times \frac{\text{محاسبه گردید. کل کنترل A570}}{\text{A570}}$ نمایش داده شد (۲۲). به منظور استخراج RNA، سلول‌ها توسط تریزول لیز شدند. به طور خلاصه، ابتدا سلول‌های تیمار شده با باکتری تحت تأثیر بافر تریزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به داخل میکروتیوب‌های DNase/RNase-free منتقل شدند و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰٪ اضافه شد. سپس تیوب‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمایی ۷۰- نگهداری شده، در روز بعد تیوب‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۲۰۰۰ rpm دور سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی دور ریخته شد رسوب در دمای محیط خشک گردید. در انتها رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل گردید. مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop (Wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده، ۵ نمونه به صورت راندوم بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. بدین منظور ابتدا ژل ۲٪ ساخته شد و نمونه‌ها پس از بسته شدن ژل بر روی ژل لود شدند و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شدند. جهت اندازه‌گیری میزان تغییرات بیان ژن به روش Real-time PCR

سلولی یکنواختی به دست آید. سپس با شمارش سلول‌ها و با توجه به محاسبات مربوط به seedind density مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسید و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر توسط میکروسکوپ، در انکوباتور قرار گرفت (۲۱). در این مرحله، سلول‌ها را با تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شد. غشاء سلول‌های مرده می‌توانند توسط تریپان‌بلو (Trypan blue) به رنگ آبی تیره رنگ شوند و اما سلول‌های زنده در برابر نفوذ این ماده به داخل غشاء سلولی مقاومت از خود نشان می‌دهد. ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول یکنواخت حاوی سلول‌ها داخل تیوب ۲ سی‌سی ریخته شد و به مقدار برابر یعنی ۱۰۰ ماکرولیتر تریپان‌بلو افزوده و به خوبی مخلوط گردید. بعد با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد. بعد میانگین بدست آمده ضربدر 10^4 و ضریب رقت شد که در این صورت تعداد سلول‌ها در یک میلی‌متر محلول بدست آمد. برای تهیه سوپرناتانت باکتری‌ها، باکتری‌های ترموفیلوس در محیط کشت مایع MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) کشت داده شدند و جهت کشت بهینه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار ۶۸ گرم از پودر آماده محیط در یک لیتر آب مقطر حل کرده و سپس محیط مورد نظر را توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. جهت نگهداری از باکتری‌های ترموفیلوس از آن‌ها استوک تهیه گردید و در فریز ۸۰- نگهداری شدند. آزمایش MTT که یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی، ۳-(۴،۵-۲،۵-yl)-2-dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی انجام می‌شود. در این روش برخلاف سایر روش‌ها مراحل شستشو و هاروست کردن سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با فتومتر در یک میکروپلیت انجام می‌شوند لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است ابتدا تعداد مناسبی از سلول‌هایی HT29 در هر یک از چاهک‌ها کشت داده می‌شوند (۱۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) بعد از ۲۴ ساعت چاهک‌ها کنترل شده و مقدار مناسبی از باکتری ترموفیلوس زنده به چاهک‌ها افزوده می‌شود به چاهک‌ها ۴ نوع OD مختلف باکتری افزوده می‌شود ۰/۵، ۱، ۱/۵ و پلیت‌ها به مدت ۲، ۶ ساعت جهت تأثیر باکتری‌ها انکوبه می‌شوند. OD باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است میزان باکتری در OD1

آزمون‌ها زمانی معنی‌دار در نظر گرفته شدند که مقدار P کمتر از ۰/۰۵ بود. و سپس نسبت بیان هر ژن نسبت به ژن رفرنس محاسبه شد. فرمول محاسبات به شرح ذیل است:

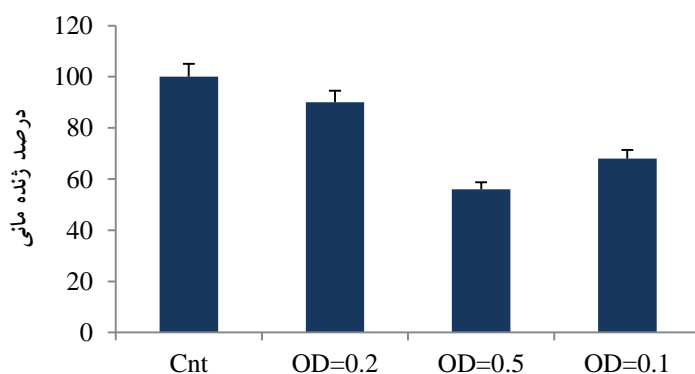
$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

یافته‌ها

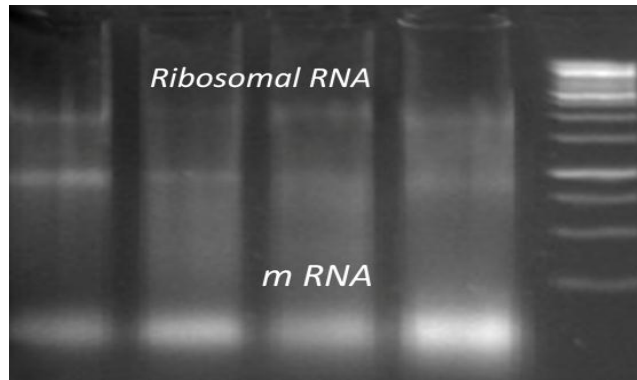
برای بررسی اثر سیتوتوکسیک باکتری ترموفیلوس و یافتن IC50 در سلول‌های KB تست MTT انجام گرفت، این تست سه بار برای هر یک از سلول‌ها تکرار شد. نتایج حاصل از آزمون MTT برحسب OD مختلف باکتری به صورت نمودار خطی (۱) به دست آمد. نتایج در تصویر و نمودارهای زیر نشان داده شد. نتایج نشان داد که IC50 در سلول HT29 برای ۴ ساعت در حالت باکتری زنده در OD1، برای ۴ ساعت می‌باشد.

جهت سنجش صحت کیفیت RNA استخراج شده که جهت ریل‌تایم مورد استفاده است، از طریق الکتروفورز کیفیت آن را مورد ارزیابی قرار می‌دهیم. در این مرحله بعد از استخراج RNA تعداد ۵ نمونه به صورت رندوم برای آن‌ها در ژل ۲٪ الکتروفورز می‌گذاریم و سپس نمونه‌ها را در زیر نور UV در دستگاه ژل‌داک مشاهده می‌کنیم. تصویر زیر نتیجه این الکتروفورز را نشان می‌دهد (به علت استخراج کم RNA متراکم $10^3 \mu$ الکتروفورز شد). همانطور که در تصویر نشان داده شده است غلظت OD=۰/۵ بیشترین کشندگی در ۴ ساعت را دارد که برای مطالعات مولکولی این غلظت مورد استفاده قرار گرفت (P=۰/۰۴).

بایستی از نمونه DNA استفاده شود. بدین منظور می‌بایست از روی نمونه RNA استخراج شده cDNA سنتز شود. RNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس reverse transcriptase به cDNA تبدیل می‌شود. برای این منظور از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase ساخت شرکت Thermo Fisher استفاده شد. دستگاهی که برای انجام Real time از آن استفاده شد (Corbett 6000) می‌باشد. محاسبه‌ی سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه انجام شد. میزان بیان در هر نمونه برای ژن‌های NF- κ B، MAPK14، و GAPDH با استفاده از مقدارهای CT محاسبه شد. بیان ژن نسبت به بیان ژن GAPDH اندازه گرفته و در واقع نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه (واحد نسبی) توسط کالیبراتور داخلی (نمونه‌های کنترل هر آزمایش) استانداردسازی شدند. مقدار تغییر یافته بیان ژن MAPK14، NF- κ B در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه‌ی کنترل که به وسیله‌ی میزان بیان ژن GAPDH نرمالیزه شده است، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه شد (۲۳). پرایمر مورد استفاده توسط نرم‌افزار oligo 5 طراحی شد و سپس توسط وبسایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST شدند که اطلاعات آن‌ها در جدول ذیل موجود است. تمام پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. در مورد نتایج به دست آمده برای میزان بیان ژن‌ها، ابتدا CT های به دست آمده برای هر ژن توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ محاسبه گردید. سپس، میانگین (سه بار تکرار) نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS در هر گروه محاسبه شد و سپس توزیع نرمال بودن نتایج توسط آزمون Shapiro Wilks بررسی گردید. برای تجزیه داده‌ها از آزمون آماری تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد و برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) استفاده گردید.

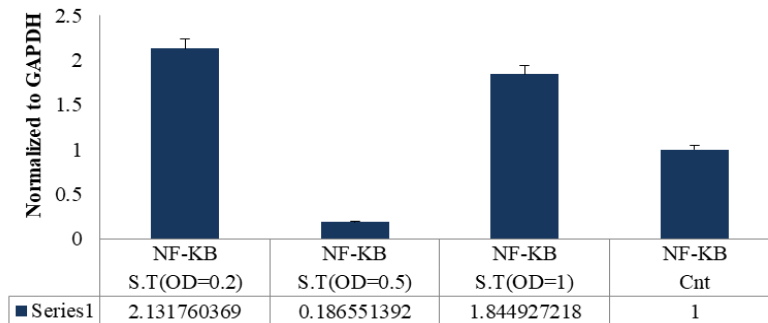


نمودار ۱: نتیجه آزمایش MTT به منظور تعیین غلظتی از باکتری همجوار شده که ۵۰ درصد سلول‌ها را کشته باشد.

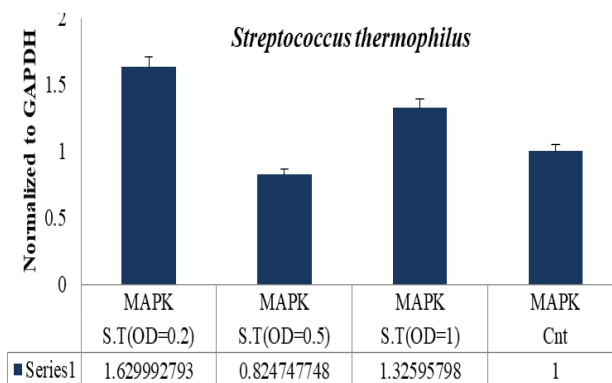


تصویر: نمونه استخراج RNA از نمونه‌های کنترل (Cnt) و نمونه‌های تیمار شده با باکتری ترموفیلوس لدر برای تایید الکتروفورز و سایز مارکر موجود ۱۰۰ bp می‌باشد.

Streptococcus thermophilus



نمودار ۲: میزان بیان NF-KB در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ترموفیلوس کشته شده. به صورت تکی به مدت ۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. و با فرمول ($CT - 2^{-\Delta\Delta}$) محاسبه شد. (اعداد بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می‌باشند). همه CTها نسبت به ژن GAPDH نرمالایز شده است. همان‌گونه که در نمودار نشان داده شده است، باکتری ترموفیلوس در OD برابر با ۰/۵ باعث بیشترین، کاهش مهار بیان ژن NF-KB شده است ($P= ۰/۰۰۱$).



نمودار ۳: میزان بیان MAPK در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ترموفیلوس کشته شده. به صورت تکی به مدت ۴ ساعت تیمار شدند و میزان تغییرات بیان ژن به روش Real time PCR مورد سنجش قرار گرفت. و با فرمول ($CT - 2^{-\Delta\Delta}$) محاسبه شد. (اعداد بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می‌باشند). همه CTها نسبت به ژن GAPDH نرمالایز شده است. همان‌گونه که در نمودار نشان داده شده است، باکتری ترموفیلوس در OD برابر با ۰/۵ باعث بیشترین، کاهش مهار بیان ژن MAPK شده است ($P= ۰/۰۰۳$).

بحث

پروبیوتیک‌ها، قرن‌هاست که به‌عنوان اجزای طبیعی برای غذاهای بهبود دهنده سلامت استفاده می‌شوند. نقش مثبت عده‌ای از باکتری‌ها در مبحث سلامت برای اولین بار توسط یک دانشمند روسی معروف به پدر ایمن‌شناسی نوین و برنده جایزه نوبل، به نام مچنیکوف، در اوایل قرن بیستم مطرح گردیده است. او معتقد بود که این امکان وجود دارد که فلور میکروبی روده را با تجویز میکروبی‌های شناخته شده مفید در مقابل میکروبی‌های مضر، تقویت و مورد حمایت قرار داد. با وجود این‌که نشان داده شده است پروبیوتیک‌ها با تقویت سیستم ایمنی می‌توانند بر رشد سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارند و نیز به‌صورت مستقیم این سلول‌ها را مهار می‌کنند اما هیچ مسیر مولکولی مشخصی برای این تشخیص داده نشده است. از جمله ژن‌های دخیل در مهار یا رشد سلول‌های سرطانی *NF-κB* و نیز *MAPK* می‌باشند (۱۰). یکی از چهارمین سرطان‌های دنیا سرطان کلورکتال است که مشخصه اصلی تمامی سرطان‌ها مقاومت دارویی است بنابراین عواملی که سلول را به سمت آپوپتوز هدایت کنند می‌تواند به عنوان عوامل ضد سرطان مطرح شوند. مطالعات مختلفی پیرامون اثرات ضدسرطانی باکتری‌های پروبیوتیک و فراورده‌های حاصل از این باکتری‌ها صورت گرفته است این فعالیت مختص باکتری بوده از یک سویه به سویه دیگر این تأثیر متفاوت است (۲۰). در مطالعه حاضر، نتایج نشان داده که *IC50* در سلول *HT-29* برای ۴ ساعت در حالت باکتری زنده در *OD1* برای ۴ ساعت می‌باشد و برای مطالعات مولکولی این غلظت مورد استفاده قرار گرفت (نمودار ۱). همجواری باکتری با سلول‌های سرطانی، سبب کاهش بیان ژن *NF-κB* و بنابراین باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی شده است. از طرف دیگر باکتری سبب افزایش بیان پروتئین *MAPK14* شده است (نمودارهای ۲ و ۳) که یکی از پروتئین‌های آپوپتوتیک می‌باشد که نتایج هم‌راستا با نتایج Choi (۲۳) می‌باشد. مطالعه انجام شده توسط Taverniti و همکاران نشان داد که سویه‌های *L. plantarum*, *L. casei*, *L. bulgaricus* سبب کاهش درصد بقای رده سلول‌های سرطانی *HT-29* می‌شوند و در این فرایند اجزای مختلف باکتری از جمله دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان، سیتوپلاسم و حتی خود باکتری کشته شده می‌تواند اثرات مهاری بر این رده سلولی داشته باشند و بیشترین تأثیر را به باکتری کشته شده نسبت می‌دهند (۲۵). مطالعه Baba و همکاران نشان داد که سلول لاکتوباسیلوس کشته شده توسط حرارت، تأثیر مهاری بر بقای سلول‌های سرطانی روده و سینه داشت (۲۶). مطالعه دیگر صورت گرفته توسط Baldwin و همکاران نشان دادند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و

لاکتوباسیلوس کازئی می‌توانند سبب افزایش القای آپوپتوز در رده سلولی کارسینوما *LS315* شوند و می‌توانند به عنوان ادجوانت با شیمی‌درمانی بکار گرفته شود (۲۷). بنابراین می‌توان گفت که باکتری‌های کشته شده و سوپرناتانت آن‌ها در مقایسه با سلول‌های زنده نیز می‌تواند اثرات ضدسرطانی داشته باشند که یکی از مکانیسم‌ها کاهش نفوذپذیری روده است (۲۸). شواهد نشان می‌دهد که تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مثل پروپیونیک اسید، استیک اسید و بوتیریک اسید مکانیسم مهم و مفید دیگری است که توسط پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها تولید می‌شوند به طوری که بوتیرات سبب ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی شده و آپوپتوز را القا می‌کند (۲۹). Mair و همکاران نشان دادند که تجویز ۴ هفته‌ای مخلوط پروبیوتیک‌ها (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius*, *L. reuteri* و *Bifidobacterium thermophilum*) سبب افزایش بیان *TGF-β* و *CDK-4* و *NF-κB* در کلون گردید (۳۰). پروبیوتیک‌ها عملکرد خود را از طریق برهم کنش با سلول‌های روده انجام می‌دهند و با این برهم کنش سیستم ایمنی روده را با تأثیر بر بیان ژن این سلول‌ها، تنظیم می‌کنند. عملکرد آن‌ها بستگی به سویه باکتری دارد، و عمدتاً پاسخ قابل تحملی را به آنتی‌ژن‌های خارجی با برهم کنش با گیرنده‌های شبه *Toll* (TLR: Toll-like receptor) و کاهش بیان *NF-κB* و سیتوکاین‌های پیش‌التهابی القا می‌کنند (۳۱).

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری که از این تحقیق بدست آمد نشان داد که باکتری‌های استرپتوکوکوس ترموفیلوس میزان بیان ژن‌های *NF-κB* را به شدت کاهش می‌دهد و باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. این تغییرات در بیان این ژن در جهت کشانده شدن سلول‌های سرطانی به سمت آپوپتوز بود از باکتری‌های استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌توان جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، بی‌خطر از نظر بیولوژیکی و هزینه کمتر باشد.

قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب صمیمانه سپاسگزاری می‌شود و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا را یاری کردند تقدیر و تشکر می‌نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی صورت نپذیرفته است.

مشارکت مولفان

م.ب.چ.ا.، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت.

منافع متقابل

منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد خانم مهدیه بهروز سرند با کد پایان‌نامه ۱۴۴۳۰۵۱۳۹۵۲۰۰۲، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بناب می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به صورت *in vitro* می‌باشد.

References

- Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011; **18**(9): 1441-1449. doi: 10.1038/cdd.2011.30
- John S K, George S, Primrose J N, Fozard J B. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorec Disease* 2011; **13**: 17-25. doi: 10.1111/j.1463-1318.2010.02221.x
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan. *Int J Cancer* 2015; **136**(5): 359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Lombardi L, Morelli F, Cinieri S, Santini D, Silvestris N, Fazio N, et al. Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. *Cancer Treat Rev* 2010; **36** suppl 3: S34-41. doi: 10.1016/s0305-7372(10)70018-9
- Lucas A S, O'Neil B H, Goldberg R M. A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011; **10**: 238-244. doi: 10.1016/j.clcc.2011.06.012
- O'Leary D P, Bhatt L F, Woolley J R, Gough D H, Wang J G, Cotter T, et al. TLR-4 Signalling Accelerates Colon Cancer Cell Adhesion via NF-κB Mediated Transcriptional Up-Regulation of Nox-1. *Plos One* 2012; **7**(10): 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0044176
- Oblak A, Jerala R. Toll-Like Receptor 4 Activation in Cancer Progression and Therapy. *Clin Dev Immunol* 2011; **2011**: 1-12. doi: 10.1155/2011/609579
- Haggar F, Boushey R. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival rates and risk factors. *J Med Sci* 2009; **22**(4): 191-197. doi: 10.1055/s-0029-1242458
- Vijayababu M, Radhakrishnan P K, Young G, Ramalingam R, Jagadish B, Eugene A, et al. " pTyr421 Cortactin Is Overexpressed in Colon Cancer and Is Dephosphorylated by Curcumin: Involvement of Non-Receptor Type 1 Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN1). *Plos One* 2014; **9**(1): 1-13.
- Diep C B, Kleivi K, Ribeiro F R, Teixeira M R, Lindgjaerde O C, Lothe R A. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2006; **45**(1): 31-41. doi: 10.1002/gcc.20261
- Altonsy M O, Andrews S C, Tuohy K M. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. *Int J Food Microbiol* 2010; **137**(2-3): 190-203. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.015
- Baldwin C, Millette M, Oth D T, Ruiz M, Luquet F-M, Lacroix M. Probiotic Lactobacillus Acidophilus and L. CaseiMix Sensitize Colorectal Tumoral Cells to 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis. *Nutr Cancer* 2010; **62**(3): 371-378. doi: 10.1080/01635580903407197.
- Jan G, Belzacq A S, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G, et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ* 2002; **9**(2): 179-188. doi: 10.1038/sj.cdd.4400935
- Cousin F, Jouan-Lanhouet S, Dimanche-Boitrel M-T, Corcos L, Jan G. MILK fermented by propionibacterium fredenreichii induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *Plos one* 2012; **9**: 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0031892
- Im Y, Oh S, Yun H S, Oh S, Kim SH. " Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett Appl Microbiol* 2010; **51**(2): 123-130. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02859.x.
- Roberfroid M B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br J Nutr* 1998; **80**: S197-202. doi: 10.1146/annurev.nutr.18.1.117
- Le Leu R K, Hu Y, Brown I L, Woodman R J, Young G P. Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis* 2010; **31**(2): 246-251. doi: 10.1093/carcin/bgp197.
- Le K, Leu R L, Brown L, Hu Y R, Bird A, Jackson M, et al. "A Synbiotic Combination of Resistant Starch and Bifidobacterium lactis Facilitates Apoptotic Deletion of Carcinogen-Damaged Cells in Rat Colon1. *J Nutr* 2005; **135**: 996-1001. doi: 10.1093/jn/135.5.996
- Iyer C, Kosters A, Sethi G B, Kunnumakkara A, Aggarwal B, Versalovic J. "Probiotic lactobacillus

- reuteri promotes tnf-induced apoptosis in human myeloid leukemia derived clls by modulation of nf-kappab and mapk signaling. *Cell Microbial* 2008; **10**: 1442-1452. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x
20. Chiu Y H, Hsieh Y J, Liao K W, Peng K C. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by Lactobacillus casei rhamnosus soluble factors. *Clin Nutr* 2010; **29**(1): 131-140. doi: 10.1016/j.clnu.2009.07.004.
 21. Oliver M H, Harrison N K, Bishop J E, Cole P J, Laurent G J. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 1989; **92**: 513-518.
 22. Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. Cytotoxicity and antimicrobial assessment of Euphoria hebecarpa. *Iran j Pharm Res* 2004; **3**(2): 75-82. doi: 10.1016/s0378-4274(03)9032 2-5
 23. Pfaffl M W. Livestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology 2003. Available online: <http://www.gene-quantification.de/habilitation.html> (accessed on 15 October 2011).
 24. Choi S S, Kim Y, Han K S, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Lett Appl Microbiol* 2006; **42**(5): 452-458. doi: 10.1111/j.1472-765x.2006.01913.x
 25. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability. *J Genes Nutr* 2011; **6**(3): 261-274. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x
 26. Baba A S, Najarian A, Shori B, Lit K.W, Keng G A. Viability of Lactic Acid Bacteria, Antioxidant Activity and In Vitro Inhibition of Angiotensin-I-Converting Enzyme of Lycium barbarum Yogurt. *AJSE* 2004; **39**(7): 5355-5362. doi: 10.1007/s13369-014-1127-2
 27. Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz M T, Luquet F M, Lacroix M. Probiotic Lactobacillus acidophilus and L. casei mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Nutr and Cancer* 2010; **62**(3): 371-378. doi: 10.1080/01635580 903407197
 28. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, et al. Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *J Dig* 2004; **69**(4): 225-228. doi: 10.1159/000079152
 29. Baricault L, Denariaz G, Hourri J J, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. 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 Carcinog* 1995; **16**(2): 245-252. doi: 10.1093/carcin/16.2.245
 30. Mair C, Plitzner C, Pfaffl M W, Schedle K, Meyer H H, Windisch W. Inulin and probiotics in newly weaned piglets: effects on intestinal morphology, mRNA expression levels of inflammatory marker genes and haematology. *Arch Anim Nutr* 2010; **64**: 304-321. doi: 10.1080/17450 39X.2010.492137
 31. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol* 2014; **20**(42): 15632-15649.