مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

اثرات سیتوسیدالی پروتئین کریستالی باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه موش در شرایط آزمایشگاهی

شکوفه بی آزار M.Sc.[۱،۲]، الهام معظمیان Ph.D.[۲*]، نگار آذرپیرا Ph.D.[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب‌شناسی، شیراز، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروب‌شناسی، شیراز، ایران
۳- دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، شیراز، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: elhammoazamian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۱

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق تاثیر پاراسپورین باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه موش در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: جداسازی توکسین کریستالی از ایزوله‌های باسیلوس تورنجینسیس انجام شد. تیمار رده سلولی سرطان سینه 4T1 با توکسین فعال شده انجام شد. از اثرات سیتوپاتیک سلولی عکس‌برداری شد. توکسین کریستالی با بیشترین خاصیت سیتوسیدالی، با استفاده از SDS-PAGE و روش مولکولی شناسایی شد.

نتایج: از ۴۷ باسیلوس تورنجینسیس، ایزوله E8 دارای بیشترین خاصیت سیتوسیدالی بر روی رده سلولی 4T1 می‌باشد. با توجه به نتایج شناسایی مولکولی ژن پاراسپورین و بررسی اندازه پروتئین جداسازی شده با استفاده از SDS-PAGE پاراسپورین-۴ شناسایی شد. پاراسپورین-۴ رده سلولی 4T1 را متلاشی نموده و دارای اثرات سیتولیزین می‌باشد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش پیشنهاد می‌کند که پاراسپورین یک پروتئین سیتولیزین بوده و دارای جایگاه اختصاصی در سطح سلول است و مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی سینه القا می‌نماید.

واژگان کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس، پاراسپورین، رده سلولی سرطان سینه، فعالیت سیتوسیدالی

مقدمه

داده‌های بهداشت عمومی حاکی از آن است که بار و فشار جهانی ناشی از سرطان پستان در زنان که به‌صورت نرخ وقوع مرگ و میر و هزینه‌های اقتصادی اندازه‌گیری می‌شود، قابل توجه بوده و در حال افزایش است (۱). در سراسر جهان، تخمین زده شده است که یک میلیون زن سالانه به سرطان پستان مبتلا می‌شوند و بیشتر از ۴۱۰ هزار نفر از آن‌ها در اثر این بیماری می‌میرند که نمایانگر ۱۴ درصد کل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان می‌باشد (۲). علاوه بر این، نرخ وقوع سرطان پستان در حال افزایش بوده و سالانه ۵ درصد جمعیت مبتلایان در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است (۳). سرطان پستان رایج‌ترین سرطان و علت اصلی منجر به مرگ ناشی از سرطان در بین زنان سراسر دنیا می‌باشد. هر ۱۹ ثانیه در گوشه ای از دنیا یک مورد سرطان پستان تشخیص داده می‌شود و هر ۷۴ ثانیه در گوشه ای از دنیا یک زن در اثر سرطان پستان می‌میرد. سال ۲۰۱۰، ۱/۶ میلیون مورد جدید سرطان پستان تشخیص داده شده است (با این نرخ، در طی ۲۵ سال آینده، ۴۱ میلیون نفر به مبتلایان آن اضافه می شود) (۴).

باسیلوس تورینجنسیس، یک باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی و اسپوردار است که انواع مختلفی از پروتئین‌های سمی در طی مرحله اسپورزایی تولید می‌کند. بعضی از سویه های غیر حشره کش باسیلوس تورینجنسیس پروتئین‌های کریستالی تولید می‌کنند که دارای اثرات ضد سرطان است (۲). به‌دلیل انتخابی بودن اثر آن‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی در انسان و نه سلول‌های نرمال، تعدادی از این پروتئین‌ها به‌طور وسیعی مطالعه شده‌اند و مکانیسم اثر آن‌ها در کشتن انتخابی سلول‌های سرطانی انسان به‌طور گسترده در ژاپن و مالزی همراه با گزارش‌های متفرقه از جاهای دیگر جهان، مطالعه شده است. فراوانی این باسیل در طبیعت و انتخابی بودن اثر آن‌ها موجب شده که کاندید بالقوه ای برای درمان سرطان باشد. هرچند، ادبیات مرتبط با اثربخشی این پروتئین‌ها در بافت زنده خیلی نادر است. از آنجایی‌که گونه‌های مختلف باسیلوس تورینجنسیس پروتئین‌های سیتوتوکسیک متفاوتی با دامنه وسیعی از اثرات ضد سرطانی و مکانیسم عمل متفاوت تولید می‌کنند، بررسی بیشتر آن‌ها و اثرات آن‌ها بر روی بافت‌های زنده ضروری است تا بتوان آن‌را در نمونه‌های انسانی استفاده نمود (۵).

ایران به لحاظ میزان شیوع سرطان سینه جزء کشورهایی با شیوع متوسط است و سالانه ۷هزار تا ۹ هزار مورد جدید ابتلا به سرطان سینه در کشور شناسایی می‌شوند. در حدود درصد زنان ایرانی به سرطان‌های پستان مبتلا هستند (۶). تاکنون تاثیر پاراسپورین ایزوله های ایرانی باسیلوس تورینجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه مورد مطالعه و بررسی قرار نگرفته است. در این مقاله اثر بازدارندگی پاراسپورین باکتری باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سولی سرطان سینه موشی مورد پژوهش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی باسیلوس تورنجینسیس: ۶۰ نمونه خاک از مناطق جغرافیایی مختلف ایران شامل استان‌های بوشهر، خراسان و خوزستان جمع‌آوری شد. جداسازی ایزوله‌ها بر اساس روش تغییر یافته سازمان بهداشت جهانی انجام شد (۷). بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری، کلنی‌های باسیلوس تورنجینسیس بر اساس مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و اسپور جداسازی شده و ایزوله‌ها از نظرمرفولوژی کلنی و تولید پروتئین کریستالی مورد بررسی قرار گرفت (۸).

رنگ‌آمیزی توکسین کریستالی: به‌منظور مشاهده توکسین کریستالی، بعد از کشت باکتری در محیط اسپورزا و ورود باکتری به مرحله اسپورزایی رنگ‌آمیزی توکسین باکتری انجام شد. در این روش نمونه باکتری را بر روی لام شیشه‌ای تثبیت نموده و با محلول حاوی رنگ ۰/۱۳۳ درصد بریلینت آبی که در اسیداستیک ۵۰ درصد حل شده رنگ‌آمیزی انجام شد. پس از شستشوی اسلاید با آب مقطر به کمک میکروسکپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰ توکسین باکتریایی مشاهده شد (۹).

جداسازی و فعال سازی پروتئین کریستالی: به‌منظور جداسازی پروتئین، کشت‌های اسپورزای باکتری را جمع‌آوری نموده و در نمک طعام یک مولار حاوی ۰/۱ درصد تریتون X-100 حل شد و به‌دنبال آن سه مرتبه شستشو با آب مقطر انجام شد. به‌منظور خالص سازی پروتئین، مخلوط اسپور و پروتئین در محلول حاوی۵۰ میلی‌مولار کربنات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۱۰) همراه با ۱۰ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول و اتیلن‌دی آمین‌تترااستیک اسید ۱ میلی‌مولار به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرم‌خانه‌گذاری شد.

سپس در دور rpm ۱۶۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید (۱۰). مایع رویی حاصل از مرحله جداسازی پروتئین برداشته شده و با آنزیم پروتئیناز کا (شرکت فرمنتاز) با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار نموده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از تیمار پروتئازی، محلول فنیل‌متیل‌سولفونیدفلوراید (شرکت فرمنتاز) یک میلی‌مولار اضافه شد (۱۱)

کشت سلول: این مطالعه در محیط آزمایشگاه و بر روی رده سلولی سرطان سینه موش (4T1) انجام شد. رده سلولی سرطان سینه از بانک سلولی انیستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌های این رده در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM ال-گلوتامین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین به میزان unit/mL ۱۰۰ و استریتوماسیون به‌میزان μg/mL ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵درصد اکسیژن و فشار ۵درصد CO_2 کشت داده شدند. شمارش سلول‌ها با کمک هموسایتومتر انجام شد. درصد سلول‌های زنده با تریپان بلو تعیین شد. به‌منظور بررسی فعالیت ضد تکثیری توکسین پروتئینی کریستالی باسیلوس تورینجینسیس ابتدا سلول‌های رده سلولی کشت داده شدند به‌طوری‌که به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای تعداد 1×10^4 سلول اضافه شد. ظروف کشت حاوی سلول به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس دوزهای مختلف توکسین به سلول‌ها اضافه شد. ابتدا توکسین کلیه نمونه‌های باسیلوس تورینجینسیس جداسازی شده با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلولی تیمار شد. سپس ایزوله‌ای که بیشترین تاثیر کشندگی را (در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی سلول‌های رده سینه داشتند انتخاب شده و با غلظت‌های مختلف توکسین (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تیمار انجام شد. نمونه کنترل مثبت (سلول‌های کشته شده با تریتون X۱۰۰) و کنترل منفی (فاقد توکسین) نیز ارزیابی شد. پس از اتمام مراحل کار کشت سلولی و اثر دادن غلظت‌های مختلف توکسین کریستالی باسیلوس تورینجینسیس بر سلول‌های هدف، به‌هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از MTT اضافه گردید. سپس به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور (۵درصد) CO_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، مایع روئی دور ریخته شد و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید به‌هر چاهک و قرار دادن آن برای مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر و دور از روشنایی، کریستال‌های فورمازان ایجاد شده حل شدند. سپس با استفاده از الیزا ریدر میزان جذب نوری چاهک ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در مقابل کنترل قرائت شد (۱۰، ۱۲).

شناسایی مولکولی ایزوله سیتوسیدال باسیلوس تورنجینسیس: استخراج DNA با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA ژنوم باکتریایی طبق دستور العمل شرکت سازنده (یکتا طب تجهیز، ایران) صورت گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با حجم ۲۵ میکرولیتر، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵/۲ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر(سیناژن-ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (سیناژن-ایران) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن-ایران) با غلظت میکروگرم بر میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)(جدول ۱)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم پلی مراز (سیناژن-ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر مخلوط شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های پاراسپورین باسیلوس تورنجینسیس *(۱۳)*

اندازه (bp)	نام ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت
۱۱۳۶	پاراسپورین ۱	ATCAAGAATTTTCCGATAATC	CCAAAAGTGCCAGAATG
۵۰۳	پاراسپورین ۲	TGTTGGGACTGTTCAGTACGT	CGTCACGGTACCTCTTAGTGT
۷۰۱	پاراسپورین ۳	GGAATCCAGGTGCACTGCT	GTCCCGGATCATACGTTGGA
۶۸۱	پاراسپورین ۴	AGTGGTCTCCAGGCTCATACTGG	TGATATTCCCGAACCTGCCCT

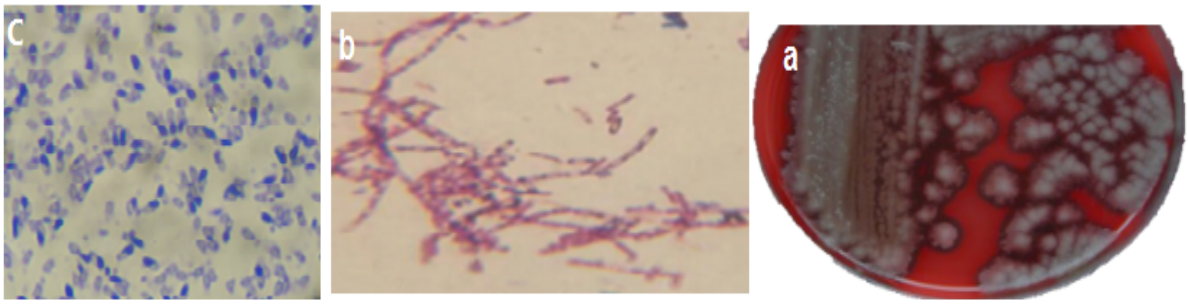
در این تکنیک برای آغاز فرآیند پلی مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر (BioRAD) به‌مدت ۱ دقیقه بر روی دمای ۹۴ درجه سلسیوس تنظیم شد و متعاقبا ۳۵ سیکل PCR به‌صورت ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۵۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت ۱ دقیقه اجرا شد. در نهایت به‌مدت ۴ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. سپس جهت اطمینان از تکثیر ژن 16S rDNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد، حاوی بافر TBE 1X به‌مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام شد (۱۳). در نهایت جهت مشاهده نتایج ژل از دستگاه UV ترانس لومیناتور استفاده شد. در نهایت محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد (جدول ۱).

بررسی اندازه پروتئین کریستالی بر اساس SDS-PAGE جهت شناسایی پروتئین از SDS-PAGE استفاده شد که شامل ژل جدا کننده ۱۲درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد می‌باشد. ژل جدا کننده حاوی یک مول Tris-HCl با pH ۸/۸، آمونیوم پرسولفات ۱۰درصد، سدیم دودسیل سولفات ۱۰درصد، ۱درصد TEMED، آکریل امید ۳۰ درصد و بیس آکریل امید ۰/۸درصد و ژل متراکم کننده حاوی یک مول اکریل آمید با pH ۶/۸، آمونیوم پرسولفات ۱۰درصد، سدیم دودسیل سولفات ۱۰درصد و ۱درصد TEMED، اکریل امید ۳۰ درصد و بیس اکریل امید ۰/۸درصد می‌باشد. رنگ آمیزی ژل‌ها بااستفاده از کومازی بلو انجام گرفت و از مارکر استاندارد فرمنتاز(SMO449) استفاده شد (۱۴).

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری

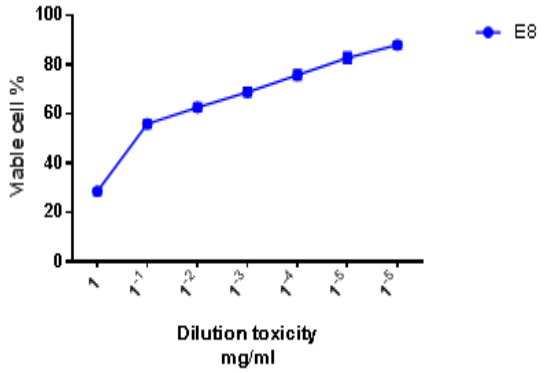
از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از سه استان شامل استان‌های بوشهر، خوزستان و خراسان با شرایط اقلیمی نسبتا مشابه ۳۸۶ ایزوله جداسازی شد. سپس بر اساس مورفولوژی کلنی و رنگ‌آمیزی گرم ۱۲۸ جدایه باسیل جداسازی شده و تحت شرایط اسپورزایی قرار گرفتند. از این میان ۴۷ جدایه باسیلوس تورنجنسیس بر اساس رنگ‌آمیزی توکسین کریستالی شناسایی شد. بیشترین ایزوله‌های جداسازی شده باسیلوس تورنجنسیس از شهرستان بوشهر حاصل شد. در نمونه‌ها توکسین کریستالی به‌شکل‌های لوزی و چسبیده به اسپور و بزرگتر از اسپور و در بعضی از نمونه‌ها توکسین به‌شکل کروی و نامنظم دیده شد (شکل ۱).



شکل۱: رنگ و شکل کلنی باکتری باسیلوس تورنجینسیس بر روی محیط آگار خوندار (a). ساختار باکتری و اسپور (b). توکسین بعد از رنگ‌آمیزی و مشاهده با میکروسکپ نوری که اسپور شفاف و توکسین تیره دیده می‌شود (c).

تاثیر توکسین باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه

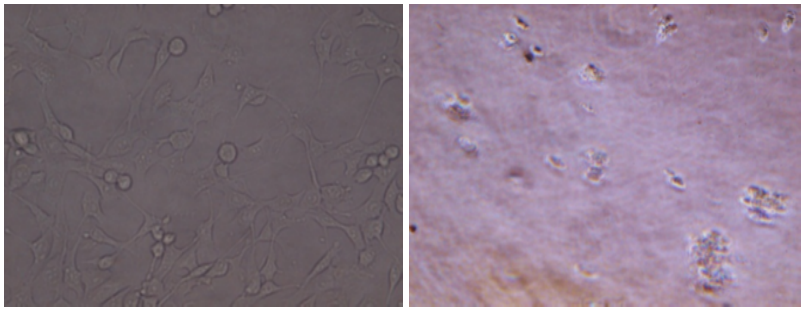
به‌منظور بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیتی توکسین پروتئینی کریستالی باسیلوس تورنجینسیس، بعد از کشت سلول‌های 4T1، به‌هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه تعداد 1×10^4 سلول اضافه شد. سپس توکسین ۱۸ ایزوله باسیلوس تورنجینسیس با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به رده سرطانی اضافه شد که ایزوله E8 بیشترین میزان سیتوتوکسیسیتی را نشان داد. ایزوله E8 بیشترین اثر سیتوتوکسیتی را بر روی رده سلولی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد که تقریبا معادل ۸۰ درصد سیستوتوکسیسیتی می باشد، نتیجه میزان سیتوتوکسیتی پروتئین فعال شده در نمودار ۱ آمده است.



نمودار۱: مقایسه اثر توکسین کریستالی ایزوله E8 باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه موش (4T1) در غلظت‌های مختلف به‌صورت سریال دایلوشن.

عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ معکوس

تیمار رده سلولی سرطان سینه با توکسین کریستالی E8 انجام شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون عکس‌برداری انجام شد. ساختار رده سلولی 4T1 دوکی شکل می‌باشد. ولی پس از تیمار با توکسین کریستالی، سلول‌ها متلاشی شده و ساختار خود را از دست دادند (شکل ۲).

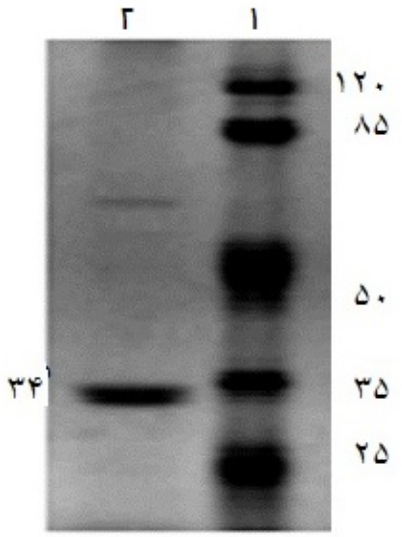


(a) (b)

شکل ۲: a) عکس‌برداری از سلول‌های کنترل منفی، b) سلول‌های تیمار شده با توکسین کریستالی E8.

نتایج SDS-PAGE

بعد از جداسازی پروتئین کریستالی با استفاده از کربنات سدیم، دی‌تیوتریتول و اتیلن‌دی آمین‌تترااستیک‌اسید، به‌منظور مشخص نمودن وزن مولکولی توکسین کریستالی نمونه E8، SDS-PAGE انجام شد. نتایج نشان داد که وزن مولکولی توکسین کریستالی تقریبا ۳۴ کیلو دالتون می‌باشد که از نظر وزن مولکولی پروتئین مشابه پاراسپورین ۴ می‌باشد (شکل ۳).

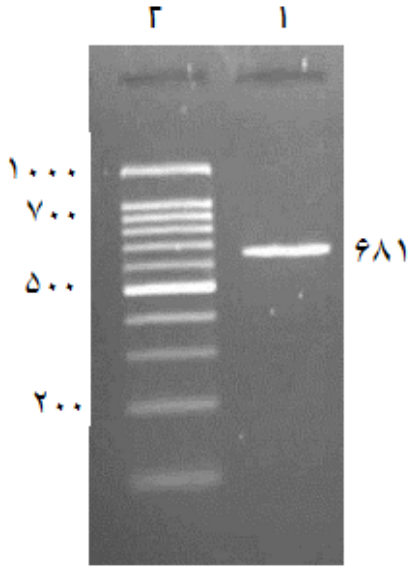


شکل ۳: نتایج SDS-PAGE. ستون۱) مارکر استاندارد فرمنتاز

(SMO449)، ستون ۲) توکسین نمونه E8

شناسایی مولکولی

بعد از تعیین وزن مولکولی پروتئین، پرایمر بر اساس ژن پاراسپورین-۴ سنتز شد و PCR انجام شد. باند ۶۸۰ جفت بازی حاصل شد که بعد از انجام تعیین توالی، ۹۸درصد همولوژی با ژن پاراسپورین-۴ باسیلوس تورنجینسیس در بانک ژنی نشان داد. نتایج در شکل ۴ آمده است.



شکل ۴: نتایج الکتروفورز. ستون ۱) قطعه تکثیر یافته با پرایمرهای اختصاصی پاراسپورین-۴ با سایز ۶۸۱ جفت باز، ستون ۲) مارکر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن.

بحث

امروزه با توجه به اینکه درمان‌های فعلی برای سرطان دارای هزینه‌های زیادی بوده و بیشتر درمان‌ها یا معمولا جواب‌گوی بیمار نمی‌باشد و یا باعث اثرات زیان‌بار دیگر در بیماران می‌شود، توجه دانشمندان و متخصصین را به سمت داروها و متابولیت‌های مستخرج از مواد طبیعی سوق داده است. یکی از کارهایی که در این زمینه صورت گرفته و هنوز در حال بررسی و پژوهش می‌باشد، استفاده از پروتئین کریستالی باکتری باسیلوس تورنجینسیس می‌باشد که یک باکتری خاک‌زی و فاقد بیماریزایی برای انسان می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که این توکسین بر روی برخی سلول‌های سرطانی، در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر سیتوتوکسیسیتی می‌باشد (۱۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران دارای درصد بالایی باسیلوس تورنجینسیس بوده و دارای توکسین لوزی شکل و کروی می‌باشند. این سم که ساختمان کریستالی از جنس پروتئین دارد برای اولین بار توسط ایشواتا معرفی شد. مرفولوژی کلنی باسیلوس تورنجینسیس خشک، به‌رنگ سفید، لبه‌های نامنظم و در وسط کلنی برآمده می‌باشد که مشابه تخم مرغ نیمرو است. مورفولوژی سلولی ارگانیسم باسیل شکل می‌باشد. این باکتری اسپور بیضی شکل در ناحیه نیمه انتهایی تولید می‌کند که با نتایج به‌دست آمده از مطالعات بائوم وهمکاران (۱۴) مطابقت داشت. در این مطالعه پاراسپورال‌ها با اندازه‌ی کوچک به رنگ آبی تیره و اسپور به شفاف دیده شد که با مشاهدات آمونز (۱۵) در مطابقت دارد.

مطالعات زیادی بر روی ویژگی‌های پاراسپورین و مکانیسم عمل آن‌ها بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی انجام شده است. مشخص شده که مکانیسم عمل این توکسین‌ها متفاوت بوده و بسته به نوع توکسین و ایزوله باکتری باعث ایجاد برآمدگی در سطح سلول، تخریب میتوکندری و تخریب اسکلت سلولی می‌شود. همچنین تغییر در ساختار اسکلت سلولی و قطعه قطعه شدن اندامک‌ها در سلول‌هایی که با توکسین مجاور شده‌اند دیده می‌شود. ناداراجاح و همکاران (۱۶) گزارش کردند که پاراسپورین در غشای پلاسمایی سلول قرار گرفته خاصیت نفوذ ناپذیری غشا را افزایش می‌دهد. این توکسین به‌عنوان یک سیتولیزین که هدف آن غشای پلاسمایی سلول هدف است عمل می‌کند که احتمالا می‌توان از آن به‌عنوان یک پارا سیتولیزین یاد کرد.

در این پژوهش از کل ایزوله های جداسازی شده، باسیلوس تورنجینسیس ایزوله E8 که از خاک اصفهان جداسازی شد دارای توکسین کریستالی از نوع پاراسپورین ۴ می‌باشد. توکسین این ایزوله دارای بیشترین اثر سیتوسیدالی قوی بر روی رده سلولی سرطان سینه می‌باشد که تایید کننده اختصاصی عمل کردن توکسین این باکتری می‌باشد که با نتایج اوکامارا و همکاران (۱۷) مطابقت دارد. همچنین در آزمایش اوکامارا فعالیت سیتوتوکسیتی پاراسپورین ۴ بر روی ۲۰ رده ی سلولی پستانداران (۱۱ سلول تومور انسانی، ۱ سلول تومور موش صحرایی و ۸ نوع سلول بافت‌های موش جونده) آزمایش شد که بیشترین اثر را روی سلول‌های روده و سلول های

۲۴۸
مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)، جلد ۷، شماره ۳، پائیز ۱۳۹۵

سرطان رحم داشت (۱۷). در این پژوهش سلول‌های رده سینه بعد از تیمار با توکسین E8، به‌نظر می‌رسد ساختار اسکلت سلولی تغییر نموده و به‌شکل کروی در می‌آیند و به‌شکل برآمدگی بزرگ همراه با تاول‌هایی در سطح سلول مشاهده شد. کیتادا و همکاران (۱۸) گزارش نمودند که پروتئین فعال ۳۰ کیلودالتونی که پاراسپورین-۲ می‌باشد، باعث ایجاد تغییرات مورفولوژی در رده سلولی HepG2 می‌شود که این تغییرات شامل ایجاد تاول‌هایی در سطح سلول‌ها و بزرگ شدن آن‌ها می‌باشد.

در تحقیق حاضر که تاثیر توکسین بر روی رده سینه انجام گرفت تغییرات مشابه با نتایج کیتادا به‌دست آمد ولی پاراسپورین-۴ شناسایی شد. سلول‌های رده سینه تحت تاثیر پاراسپورین فعال شده ایزوله E8 به‌شکل برآمدگی‌هایی در سطح سلول، بزرگ شدن سلول‌ها و در برخی سلول‌ها متلاشی شدن سلول‌ها مشاهده شد. کیتادا و همکاران (۱۸) علت ایجاد برآمدگی در سطح سلول را افزایش نفوذپذیری غشا پلاسمایی و آسیب رساندن پاراسپورین در غشا اعلام نمودند. با توجه به متفاوت بودن درصد سیتوتوکسیسیتی توکسین ایزوله‌های مختلف باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه، این نتایج نشان دهنده وجود گیرنده اختصاصی برای این توکسین کریستالی در سطح سلول می‌باشد که کیتادا و همکاران (۱۸) نیز نتایج مشابه را گزارش نمودند.

با توجه به اینکه نتایج این پژوهش هم‌سو با نتایج سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه می‌باشد، به‌منظور تکمیل نتایج و جامع تر شدن ابعاد این بررسی، پیگیری فعالیت سیتوسیدالی توکسین کریستالی در سطح *in vivo* پیشنهاد می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش تایید کننده اثر مهاری توکسین کریستالی باکتری باسیلوس تورنجینسیس، با خاصیت سیتوسیدالی بر روی رده سلولی 4T1 می‌باشد. توکسین کریستالی سویه ایرانی موجب مهار تکثیر رده سرطانی شده که تاکنون در هیچ مطالعه ای بررسی نشده و برای اولین بار در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که نتایج این مطالعه کار در محیط آزمایشگاهی است. لزوم انجام تحقیقات بیشتر مورد تاکید می‌باشد.

منابع

1. Mirmalek SA, Kani E. Clinical Application OF Breast Cancer Biology. J of Iranian surgery. 2009; 17(1): 1-17.
2. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, et al. Unique Activity Associated With Non-Insecticidal Bacillus Thuringiensis Parasporal Inclusions; In vitro Cell- Killing Action On Human Cancer Cells. J.Appl. Microbiol. 2009; 86: 477-486.
3. Lehrer S, Green S, Rosenzweig KE. Affluence and Breast Cancer. Breast J. 2016; 22(5):564-7. [Epub ahead of print].
4. Williams F, Thompson E. Disparity in Breast Cancer Late Stage at Diagnosis in Missouri: Does Rural Versus Urban Residence Matter? J Racial Ethn Health Disparities. 2016; 3(2): 233-9.
5. Akiba H, Abe Y, Kitada S, kusakaY, et al. Crystal Structure of the Parasporin-2 Bacillus Thuringiensis Toxin That Recognize Cancer Cells. J Mol Biol. 2009; 13: 38(1): 33-121.
6. Enayatrad M, Amoori N, Salehiniya H. Epidemiology and Trends in Breast Cancer Mortality in Iran. Iranian Journal of Public Health, 2015; 44(3): 430-431.
7. Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, et al. Parasporin, A Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of Bacillus Thuringiensis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000; 7 (4): 625-634.
8. Santana MA, Moccia CC, Gillis AE. Bacillus thuringiensis improved isolation methodology from soil samples. J. of Microbiol. Methods. 2008; 75(2): 357-358.
9. Moazamian E, Bahador N, Rasouli M, Azarpira N, et al. Investigation of Cytocidal Activity of Bacillus Thuringiensis Parasporal Toxin on CCRF-CEM Cell Line. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2012; (4): 247-253.
10. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, A New Anti-Cancer Protein Group from Bacillus Thuringiensis. Anticancer Res. 2009; 29(1): 427-433.
11. Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Mizuki E, et al. Identification and Characterization of a Novel Cytotoxic Protein, Parasporin-4, Produced by Bacillus Thuringiensis A1470 Strain. Biotechnol. Annu. Rev. 2006; 14: 225-252.
12. Nabiuni M, Yarahmadi A, Delfan B, Mirsepasi S. The anti-proliftrative and lethal effects of D-alpha tocopheryl succinate (vitamin E succinate) and Honey bee venom (BV) on human promylocyte leukemia cell line (HL-60). JCT. 2013; 3(4): 287-296.
13. Lenina NK, Naveeenkumar A, Sozhavendan AE, Balakrishnan N, et al. Charactrrization of parasporin gene harboring Indian isolate of Bacillus thuringiensis. 3 Biotech. 2014; 4(5): 545-551.
14. Baum JA, Kakefuda M, Gawron-Burke C. Engineering Bacillus thuringiensis bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. Appl Environ Microbial 1996; 62(12): 4367-4373.
15. Ammons D. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for Bacillus thuringiensis. J of Invertebrate Patholo, 2002; 79(3): 203-204.
16. Nadarajah V, Ting D, Chan K, Mohamed S, et al. Selective Cytotoxicity Activity Against Leukaemic Cell Lines from Mosguitocidal Bacillus Thuringiensis Parasporal Inclusions Southeast. Asian Journal of Tropical Medicine and Public Healt. 2008; 39(2): 235-245.
17. Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, et al. Mode of Action of Parasporin-4, A Cytocidal Protein from Bacillus Thuringiensis. Biophys. Acta. 2011; 1808: 1476-1482.
18. Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, et al. Cytocidal Actions of parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from Bacillus thuringiensis. J of Biolo Chem, 2006; 281(36): 26350-26360.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2017; 7(3):

Cytocidal effects of Bacillus thuringiensis crystal protein on mice breast cancer cell line in in vitro condition

Shekufe Biazar Sh. M.Sc.[1,2], Moazamian E. Ph.D.[2*], Azarpira N. Ph.D.[3]

1. M.Sc. student, Department of Microbiology, College of Science, Science and research branch, Islamic Azad University, Fars, Iran
2. Department of Microbiology, College of Science, Agriculture and modern technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3. Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

* Email corresponding author: elhammoazamian@gmail.com

Received: 15 Jun. 2016 Accepted: 11 Sep. 2016

Abstract

Aim: In the study, the effects of *Bacillus thuringiensis* parasporin were examined on mice cancer cell line (4T1).

Material and Methods: Purification of crystal toxins was done from the isolates of *B. thuringiensis*. Breast cancer cells line 4T1 were treated with activated toxins. Cytopathic effects were photographed. Crystal toxin with the most cytotoxicity was identified by using SDS-PAGE and also molecular method.

Results: From forty seven tested isolates of *B. thuringiensis*, E8 isolate shown the most cytotoxicity effect on 4T1 cell line. In addition, parasporin-4 was identified by using SDS-PAGE and PCR methods. Parasporin-4 disintegrated 4T1 cell line and it has cytolysin effects.

Conclusion: Our data suggest that, parasporin is cytolysin protein and has a specific site on the cell surface. This crystal protein can induce apoptosis in breast cancer cell line.

Key words: *Bacillus thuringiensis,* Parasporin, Breast cancer cell line, Cytotoxicity activity