مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دهم، بهار ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی رده ی سلولی سرطانی معده

فریبا گودرزی*[۱]، اسداله اسدی[۲]، صابر زهری[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲]استادیار گروه زیست شناسی، بخش زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۳]دانشیار گروه زیست شناسی، بخش زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان های معده- روده ای از شایع ترین سرطان ها در سراسر دنیا می باشند که علت توزیع این سرطان ها فاکتورهای محیطی و ارثی می باشد، فاکتورهایی مانند عادت های غذایی، فعالیت فیزیکی و کشیدن سیگار نقش بسیار مهمی در ابتلا به این سرطان ها ایفا می کنند، سرطان معده چهارمین سرطان متداول و دومین سرطان مرگبار در دنیاست. نایسین، پپتیدی ضد میکروبی با ۳۴ بنیان اسید آمینه است و به علت دارا بودن آمینواسید لانتیونین جزو خانواده ی لانتی بیوتیک هاست. هدف از این مطالعه بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی نایسین بر روی رده ی سلولی سرطانی معده می باشد.

مواد و روش ها: به منظور مطالعه ی اثر سایتوتوکسیک باکتریوسین نایسین بر روی سلول های AGS، این سلول ها به تعداد 10^4 سلول در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت داده شدند و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد، با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوای مرطوب انکوبه شدند، پس از ۲۴ ساعت این سلول ها با غلظت های مختلف ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار نایسین تیمار شدند و برای هر غلظت ۳ بار تکرار انجام شد، در نهایت اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی این سلول ها در بازه های زمانی ۲۴, ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار بررسی شد.

یافته ها: در هر سه بازه ی زمانی مشاهده شد که با افزایش غلظت نایسین قابلیت زیستایی سلول ها کاهش می یابد، به علاوه تیمار سلول ها در بازه ی زمانی طولانی تر اثر سایتوتوکسیسیتی بیشتر دارد.

نتیجه گیری: بسیاری از پپتیدها با داشتن فعالیت های بیولوژیکی به عنوان عوامل درمانی استفاده می شوند؛ از جمله ی این پپتیدها نایسین می باشد که باعث مرگ در سلول های AGS می شود، اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی این سلول ها وابسته به غلظت و زمان است.

کلمات کلیدی: نایسین، AGS، سایتوتوکسیسیتی

مقدمه

نایسین یک پپتید ضدباکتریایی با ۳۴ بنیان اسید آمینه است که توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس[۱] زیرگونه ی لاکتیس تولید می شود (۳،۱۳،۷)، این پپتید متعلق به کلاس I از خانواده ی باکتریوسینی لانتی بیوتیک ها می‌باشد (۱۹) که دارای وزن مولکولی ۳/۵ کیلو دالتون بوده و با داشتن ۴ بار مثبت پپتیدی کاتیونیک است؛ نایسین دارای اسید آمینه های غیر معمولی نظیر دهیدروآلانین، دهیدروبوتیرین، لانتیونین و متیل لانتیونین می باشد که توسط تغییرات پس ترجمه های ایجاد می شوند (۴)؛ این پپتید هیدروفوبیک به طور مشخص دارای پنج حلقه ی لانتیونین است که از ایجاد باند تیو اتری بین دو بنیان آلانین ایجاد می شوند (۴،۵).نایسین در مقابل برخی سلول های گیاهی اولیه و اسپورهایی از باکتری های گرم مثبت مانند دیگر باکتری های اسید لاکتیک[۲]، باسیلوس[۳]، کلستریدیوم[۴]، لیستریا[۵] و جنس هایی از استرپتوکوکوس[۶] فعال می باشد (۱۸،۱۷). به دلیل خاصیت ضد میکروبی نایسین این پپتید به صورت گسترده به عنوان محافظ مواد غذایی استفاده می شود. در سال ۱۹۸۸ سازمان غذا و داروی آمریکا نایسین را به عنوان یک

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی سلولی مولکولی- دانشکده علوم پایه- دانشگاه محقق اردبیلی- اردبیل- ایران
Email: Faribagoodarzi@yahoo.com.*
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۷

1-Lactococcus lactis
2-Lactic acid bacteria
3-Bacillus
4-Clostridium
5-Listeria
6-Streptococcus
7-Generally Recognized as Safe

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.2.2]

ماده ی GRAS[۷] برای استفاده در صنایع غذایی معرفی کرد و پس از آن نیز توسط اتحادیه ی اروپا مورد تایید قرار گرفت (۹،۸). اکنون بیش از ۵۰ سال است که در ۵۰ کشور در سراسر دنیا نایسین به عنوان نگه دارنده استفاده می شود. اخیرا مطالعات بسیاری بر روی پتانسیل درمانی نایسین به عنوان یک ماده ی موثر غیر سمی در مقابل برخی از انواع سلول های سرطانی صورت گرفته است؛ از جمله ی آن ها می توان به بررسی اثر نایسین به عنوان تعدیل گر ایمنی بر روی سلول های لنفومای جورکت و سلول های Molt4 (۲) و نیز بررسی اثر سرکوبگری نایسین بر روی رده ی سلولی سرطانی OSCC[1] اشاره کرد (۲۰). سرطان های معده-روده ای از شایع ترین سرطان ها در سراسر دنیا می‌باشند که علت توزیع این سرطان ها فاکتورهای محیطی و ارثی می باشد، فاکتورهایی مانند عادت های غذایی، فعالیت فیزیکی و کشیدن سیگار نقش بسیار مهمی در ابتلا به این سرطان ها ایفا می کنند، تقریبا ۵۰ درصد از سرطان های معده-روده ای، سرطان معده می باشد (۲۱). چندین نوع متفاوت از سرطان معده وجود دارد که متداول ترین آن آدنوکارسینوما می باشد که منشاء آن سلول های آستر معده می باشد (۱). آدنوکارسینومای معده با نرخ بالایی در مردان بالای ۴۰ سال مشاهده می شود. میزان مرگ و میر ناشی از سرطان معده به طور خاص در آسیا، آمریکای جنوبی و بخش هایی از اروپا بالا می باشد. سرطان معده چهارمین سرطان متداول و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در دنیا می باشد (۶). این سرطان در شمال و شمال غربی ایران از جمله اردبیل نیز دارای نرخ بالایی است (۱۴). عفونت با هلیکوباکتر پیلوری، مصرف غذای پر نمک و کشیدن سیگار از جمله فاکتورهای محیطی دخیل در سرطان معده در ایران می باشند (۱۶). امروزه درمان سرطان معده همچنان به عنوان یک چالش عمده باقی مانده است (۲۲،۱۵،۱۲). در این مطالعه بر اساس خصوصیات درمانی نایسین و غیر سمی بودن آن برای بدن و همچنین حساسیت شیمیایی سلول های سرطان معده ، اثرات سایتوتوکسیک این پپتید بر روی رده ی سلولی سرطانی معده بررسی می شود.

مواد و روش ها

آماده سازی نایسین: پودر تجاری Nisapline از شرکت مرک آلمان (N5764) تهیه شد. محلول نایسین با حل نمودن ۲۴/۱ mg از پودر Nisapline در ۲ میلی لیتر HCL ۰/۰۲ نرمال به دست آمد و با اضافه کردن ۶ میلی لیتر از محیط کشت RPMI1640 محلول استوک به دست آمد که با رقیق سازی بیشتر غلظت های ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار از نایسین آماده شد.

آماده سازی سلول سرطانی معده برای تیمار با نایسین

رده ی سلولی سرطان معده (AGS) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و به منظور انجام آزمایش در محیط کشت RPMI1640، محیط حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی[۱] و ۲٪ آنتی بیوتیک های پنیسیلین-استرپتومایسین خریداری شده از شرکت ایده زیست تکثیر داده شد. به منظور مطالعه ی اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی سلول های AGS، این سلول ها با تریپان بلو شمارش شد و به تعداد 10^4 سلول در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت داده شدند؛ سپس به مدت یک شبانه روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد، با ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوای مرطوب انکوبه شدند تا به رشد کافی برسند.

تیمار و بررسی بقای سلول ها

پس از آماده سازی سلول، سلول ها با غلظت های مختلف ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار نایسین تیمار شدند و برای هر غلظت ۳ بار تکرار انجام شد، سپس اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی این سلول ها در بازه های زمانی ۲۴, ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. به منظور بررسی بقای سلول ها در غلظت های مختلف و در بازه های زمانی متفاوت از روش MTT استفاده شد. MTT از شرکت مرک آلمان خریداری شد، MTT نمک محلول زرد رنگی است که میتوکندری های سلول توانایی احیاء آن را دارد که از احیاء آن کریستال های بنفش رنگ نامحلولی به نام فورمازان تولید می شود. به منظور بررسی بقای سلول ها با تست MTT در پایان بازه های زمانی تیمار محیط کشت رویی سلول ها را تعویض کرده و به سلول ها محیط کشت جدید حاوی ۱۰٪ محلول MTT اضافه شد؛ پس از آن سلول ها به مدت ۳-۴ ساعت در انکوباتور و در شرایط تاریکی نگه داری شدند تا

1-Oral squamous cell carcinoma
2-Fetal Bovine Serum

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.2.2]

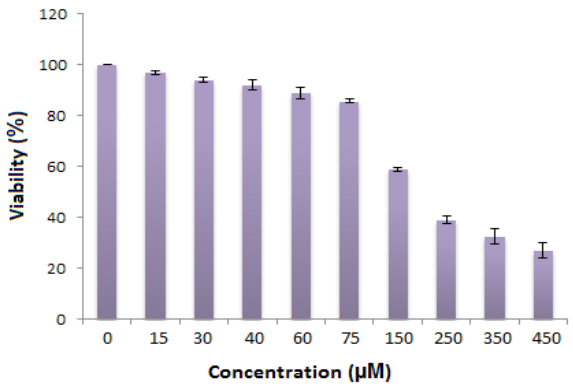
کریستال های نامحلول فورمازان تشکیل شوند؛ پس از آن با جایگزینی DMSO به جای محلول MTT کریستال ها حل شده و رنگ ارغوانی ایجاد شد، هرچه شدت رنگ بیشتر باشد نشانگر تعداد سلول های زنده ی بیشتری است (شکل۱). جذب نوری محلول ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری می شود (۱۱،۱۰).

تجزیه و تحلیل

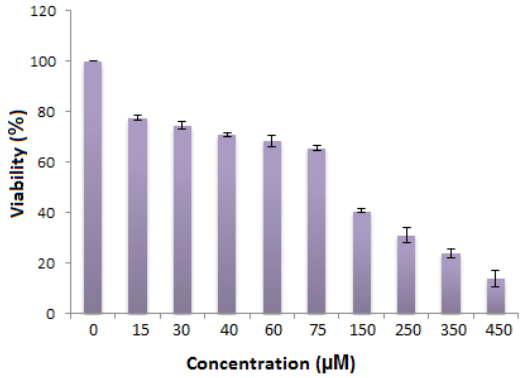
پس از اندازه گیری جذب نوری محلول ها IC_{50} سلول ها در هر بازه ی زمانی محاسبه و نمودار مربوط به آن ها رسم شد.

یافته ها

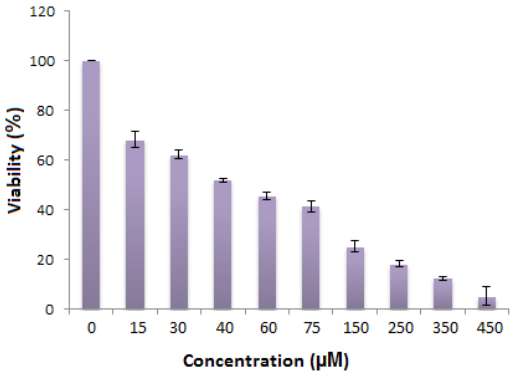
نمودارهای ۱ , ۲ و ۳ به ترتیب اثر غلظت های مختلف نایسین را بر روی رده ی سلولی سرطانی معده پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می دهد، نمودار ۴ تاثیر غلظت های مختلف نایسین را بر روی سلول های AGS در بازه های زمانی مختلف و نمودار ۵ رابطه ی میان زمان و اثر سایتوتوکسیک نایسین را نشان می دهد. همان طور که در نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ مشاهده می شود با افزایش غلظت نایسین اثر سایتوتوکسیک آن بر سلول های سرطانی معده افزایش می یابد. مطابق نمودار ۵ نیز تیمار سلول ها با نایسین در بازهی زمانی طولانی تر اثر سایتوتوکسیک بیشتری نشان می دهد؛ به طوری که مقدار IC50 در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر ۲۶۱/۴، ۱۸۱/۶۹ و ۹۸/۶۷ میکرومولار می باشد.



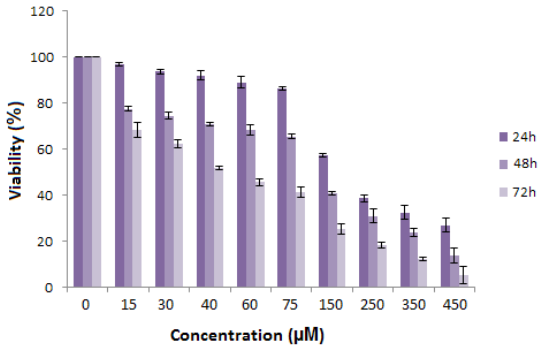
نمودار ۱- بررسی اثر غلظت های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار نایسین به مدت ۲۴ ساعت بر روی رده ی سلولی AGS. در این حالت مقدار IC50 برای نایسین برابر ۲۶۱/۴ میکرومولار است.



نمودار ۲- بررسی اثر غلظت های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار نایسین به مدت ۴۸ ساعت بر روی رده ی سلولی AGS. در این حالت مقدار IC50 برای نایسین برابر ۱۸۱/۶۹ میکرومولار است.



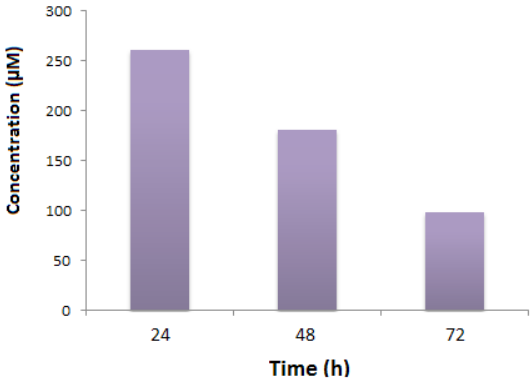
نمودار ۳- بررسی اثر غلظت های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ میکرومولار نایسین به مدت ۷۲ ساعت بر روی رده ی سلولی AGS. در این حالت مقدار IC50 برای نایسین برابر ۹۸/۶۷ میکرومولار است.



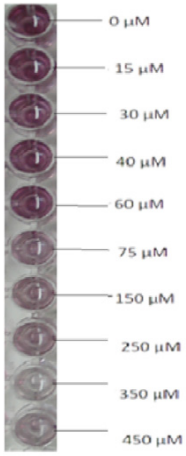
نمودار ۴- مقایسه ی تاثیر نایسین بر روی سلول های AGS با غلظت های متفاوت در شیب زمان.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.2.2]



نمودار ۵- مقایسه ی تاثیر سایتوتوکسیک نایسین در طی بازه های زمانی مختلف.



شکل ۱- آزمون MTT به منظور بررسی اثر سایتوتوکسیک نایسین بر روی سلول های AGS؛ هرچه شدت رنگ بیشتر باشد نشانگر تعداد سلول های زنده ی بیشتری است. همان طور که در این شکل مشاهده می شود با افزایش غلظت نایسین تعداد سلول های زنده کاهش می یابد.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نایسین در غلظت های ۴۵۰ میکرومولار اثر سایتوتوکسیسیتی بالایی بر روی رده ی سلولی سرطانی معده دارد که این امر می‌تواند به علت القای آپوپتوز در این سلول ها باشد؛ این نتایج با یافته های Begde و همکاران (۲۰۱۰) بر روی سلول های ایمنی و یافته های Ritchie و همکاران بر روی سلول های OSCC (۲۰۱۰) مشابهت دارد. همچنین نایسین در بازه های زمانی طولانی تر اثر سایتوتوکسیسیتی بیشتری بر روی رده ی سلولی AGS دارد؛ به طوری که ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول ها با غلظت ۴۵۰ میکرومولار نایسین تقریباً ۹۰ درصد سلول ها دچار مرگ شدند. با توجه به این نتایج پیشنهاد می شود که نایسین بر روی رده های سلولی سرطانی مختلف مورد آزمایش قرار گیرد و نیز مکانیسم مولکولی عملکرد آن در درون سلول مورد بررسی قرار گیرد. به طور کلی می توان گفت که نایسین دارای پتانسیل درمانی بوده و در غلظت های بالاتر و در بازه های زمانی طولانی تر دارای اثر سایتوتوکسیسیتی بیشتری بر روی برخی از انواع سلول های سرطانی از جمله رده ی سلولی سرطانی معده می باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از راهنمایی های ارزنده اساتید راهنمای محترم جناب آقای دکتر اسداله اسدی و آقای دکتر صابر زهری و حمایت های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.2.2]

منابع

(1)Alberts SR, Cervantes A & C.J. van de Velde, Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. Ann Oncol, 2003; 14 Suppl 2:ii31-6.
(2)Bedg D, Bundale S, Mashitha P, Rudra J, Nashikkar N, Upadhyay A. Immunomodulatory efficacy of nisin- a bacterial lantibiotic peptide. Journal of peptide science, 2011; 17: 438-444.
(3)Breukink E, DE Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not?. Biochimica et Biophysica Acta, 1999; 1462:223-234.
(4)Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem, 1998; 263: 16260-16266.
(5)Chan WC, Bycroft BW, Lian L, Roberts GCK. Isolation and characterization of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin. FEBS Lett, 1989; 254: 29-36.
(6)Crew KD & Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. World J Gastroenterol, 2006; 12(3):354-62.
(7)DE Vuyst EL, Vandamme EJ. Nisin, a lantibiotic produced by Lactococcus subsp. lactis. Blackie Academic and Professional: London, 1994; 151.
(8)Delves-Broughton J. Nisin as a food preservative. Food Aust, 2005; 57(12): 525-527.
(9)Delves-Broughton J, Gasson MJ. Nisin. In Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. CAB International: Wallingford, 1994; 99.
(10)Doyle A, Griffiths J.B. Cell and tissue culture. Laboratory procedures in biotechnology. John Wiley and Sons Ltd, 1998; England. 345 pp.
(11)Helganson CD, Miller CL. Basic cell culture protocols, 2003; Human press Inc, vol 290, 365pp.
(12)Jafari N, Bohlooli SH, Mohammadi S, Mazani M. Cytotoxicity of Methylsulfonylmethane on Gastrointestinal (AGS, Hepg2, and KEYSE-30) Cancer Cell Line, 2011; Springer Science+Business Media.Gastrointest Canc, DOI 10.1007/s12029-011-9291-z.
(13)Liu W, Hansen JN. Some chemical and physical properties of nisin, a asmall-protein antibiotic produced by Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol, 1990; 56: 2551-2558.
(14)Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z, Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med, 2009; 12(6):576-83.
(15)Moehler M, et al. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Multimodal treatment of gastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2007; 21(6):965-81.
(16)Pourfarzi F et al. The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran-a population based study. Int J Cancer, 2009; 125(8):1953-60.
(17)Sahl HG, Bierbaum G. Multiple activities in natural antimicrobials. Microbe, 2008; 3(10): 467-473.
(18)Severina E, Severin A, Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens.J.Antimicrob. Chemother, 1998; 41: 341-347.
(19)Smith L, Hillman JD. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. Current Opinion in Microbiology, 2008; 11 :401–408.
(20)Ritchie K, Joo KE, Kamarajan P, Kapila Y. Nisin, a Bacteriocin and Food-Additive, Suppresse OSCC in vitro- in vivo. Washington, DC. March 3-6, 2010; 1277 AADR(ANNUAL MEETING).
(21)Taghavi N et al. Epidemiology of upper gastrointestinal cancers in Iran: a sub site analysis of 761 cases. World J Gastroenterol, 2007; 13(40):5367-70.
(22)Wong R, Cunningham D. Optimising treatment regimens for the management of advanced gastric cancer. Ann Oncol, 2009; 20(4):605-8.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.10.2.2]