ارزیابی اثرات هم‌افزایی ضد سرطانی باکتری *E. coli* DH5α و ترکیب ضدالتهاب گلیسیریزیک اسید بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون

امین افخمی پوستچی[۱]، مهرداد ایرانشاهی[۲،۳]، منصور مشرقی[۱،۴] ، حسین سیدمرادی[۱]، مریم مقدم متین[۱،۴،۵،*]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۵. گروه تحقیقاتی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

Email: a.afkhami.p@mail.um.ac.ir

چکیده

سرطان‌های دستگاه گوارش به‌خصوص روده بزرگ یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در جوامع غربی بوده و به دلیل تغییر الگوی تغذیه‌ای در جوامع در حال توسعه نیز، بروز این‌گونه سرطان‌ها در حال افزایش است. با توجه به عدم موفقیت کامل روش‌های درمانی رایج در کنترل بیماری سرطان، احساس نیاز به روش‌های تجربی و جایگزین بیشتر حس می‌شود. نوعی از این‌گونه روش‌ها، باکتری درمانی سرطان است که یکی از قابل اعتمادترین انواع آن، روش مهار رشد و از بین بردن توده سرطانی با مکانیسم اختصاصی پیش دارو-آنزیم است. اساس این روش تبدیل یک پیش‌داروی غیر سمی به دارویی سمی در درون و یا اطراف سلول سرطانی توسط باکتری دارای آنزیم تبدیل‌کننده پیش‌دارو است. در پژوهش حاضر، از باکتری *E. coli* DH5α که واجد آنزیم بتا-گلوکورونیداز است برای تبدیل ترکیب گلیسیریزیک اسید که خواص ضدالتهابی و ضد سرطانی آن اثبات شده است، به متابولیت فعال آن استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد به‌کارگیری هم‌زمان این دو عامل درمانی نسبت به تیمار با ترکیب گلیسیریزیک اسید به‌تنهایی، دارای خواص مهاری بسیار قوی‌تری بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون می‌باشد. در مراحل بعد، به تأیید نتایج فوق در مطالعات حیوانی پرداخته خواهد شد.

کلمات کلیدی: باکتری درمانی سرطان، باکتری *E. coli* DH5α، ترکیب گلیسیریزیک اسید، طب گیاهی، سرطان کولون

مقدمه

بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرطان را می‌توان به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان به شمار آورد. باوجود پیشرفت‌های علمی بسیار حاصل شده در زمینه تشخیص، درمان و مراقبت از درمان در بیماری سرطان، هنوز این بیماری به‌عنوان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در گستره جهانی مطرح می‌باشد، به‌طوری‌که شمار افراد مبتلا به آن به‌طور پیوسته‌ای در حال افزایش است. روش‌های مختلفی مانند جراحی، شیمی‌درمانی و ایمنی‌درمانی برای درمان سرطان معرفی شده‌اند اما هیچ‌کدام توفیق قابل توجهی در این امر نداشته و بیشتر این روش‌ها تنها در به تأخیر انداختن رشد تومور مؤثر بوده‌اند (Khan et al., 2013). مقاومت به درمان‌های رایج سرطان در بیماران با تومورهای پیشرفته، مسیر درمان را به سمت روش‌های درمانی جایگزین سوق داده است. ازاین‌رو یافتن روش‌های درمانی نوین، هدفمند و جایگزین که دارای تأثیرات درمانی مطلوب با حداقل اثرات جانبی آسیب‌رسان باشند، در انواع مختلف سرطان‌ها به‌خصوص سرطان‌های دستگاه گوارش که به‌طور افسارگسیخته‌ای در حال افزایش هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از جمله این روش‌های جایگزین می‌توان

به ژن‌درمانی[1] تلومراز درمانی[2] فتودینامیک تراپی[3] و گرما افزایی[4] اشاره کرد. این امر اثبات شده است که برخی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تجمع و تکثیر اختصاصی در سلول‌های سرطانی و رشد در ریز محیط توموری[5]را دارند که این موضوع پتانسیل بزرگی برای درمان هدفمند سرطان را به وجود آورده است (Patyar et al., 2010). باکتری‌های مهندسی ژنتیکی شده می‌توانند به‌طور اختصاصی تومورها را هدف گرفته و مرگ سلولی قابل کنترلی را در سلول‌های سرطانی القاء کنند. به علاوه، این باکتری‌ها می‌توانند از طریق رقابت بر سر منابع غذایی و یا ترشح محصولات سمی باکتریایی، به‌خودی‌خود باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند. تجمع و تکثیر اختصاصی این باکتری‌های تجویز سیستمیک شده در نواحی سرطانی به برخی عوامل مرتبط با تومور به‌خصوص شرایط هایپوکسی[6]در محیط تومورها و نیز سرکوب سیستم ایمنی در ریز محیط اطراف تومور وابسته است (Cheng et al., 2008, 2013; Hsieh et al., 2015; Zu & Wang, 2013) . از میان معدود روش‌های باکتری درمانی سرطان، یکی از جدیدترین و قابل اعتمادترین روش‌ها، درمان باکتریایی هدفمند آنزیم-پیش‌دارو می‌باشد که در سال‌های اخیر در برخی سرطان‌ها مورد کار آزمایی بالینی نیز قرارگرفته است (Nemunaitis et al., 2003). پایه مشترک این روش درمانی عبارت است از تبدیل یک پیش‌داروی[7]غیر سمی به یک داروی سمی در درون و یا در ریز محیط اطراف سلول سرطانی توسط باکتری که دارای آنزیم تبدیل‌کننده پیش‌دارو بوده و به‌طور اختصاصی در محل تومور تجمع یافته و تکثیر می‌یابد (Stritzker et al., 2008). این روش درمانی بر اثرات جانبی آسیب‌رسان و غیرقابل قبول روش‌های باکتری درمانی غلبه می‌کند (Cheng et al., 2008, 2013; Hsieh et al., 2015; Lehouritis, Springer, & Tangney, 2013). باکتری *E. coli* در زمره باکتری‌های فلور طبیعی روده است که اندوتوکسین ترشح نمی‌کند و به‌طور ذاتی آنزیم بتا-گلوکورونیداز را تولید می‌کند (Hsieh et al., 2015). در پژوهش حاضر، برای اولین بار از همراهی این باکتری با ترکیب گیاهی و ضدالتهاب گلیسیریزیک اسید[8]که در اثر آنزیم بتا گلوکورونیداز باکتری در روده، واحد گلوکورونیک اسید آن جدا شده و به متابولیتی فعال با خاصیت ضدالتهابی و ضدسرطانی بالاتر تبدیل می‌شود، به‌منظور بررسی اثر مهاری این مکانیسم پیش‌دارو-آنزیم، بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون در شرایط برون تنی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری و سلول‌های سرطانی

باکتری *E. coli* DH5α در محیط Luria–Bertani (LB) کشت داده شده و در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. سلول‌های رده CT26 سرطان کولون از انستیتو پاستور تهران خریداری شده و در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 کشت و نگهداری شدند.

آماده‌سازی غلظت‌های مختلف ترکیب گلیسیریزیک اسید

ابتدا ۱۶/۴۵ میلی‌گرم از این ترکیب در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل حل شده و غلظت اولیه ۲۰ میلی‌مولار به دست آمد. سپس با رقت سازی سریالی، غلظت‌های نهایی (۱۰۰۰-۳۱ میکرومولار) برای تیمار سلول‌ها آماده شدند.

[1] Gene Therapy
[2] Telomerase Therapy
[3] Photodynamic Therapy
[4] Hyperthermia Therapy
[5] Tumor Microenvironment
[6] Hypoxia Conditions
[7] Prodrug
[8] Glycyrrhizic acid (GL)

آزمون سنجش اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی

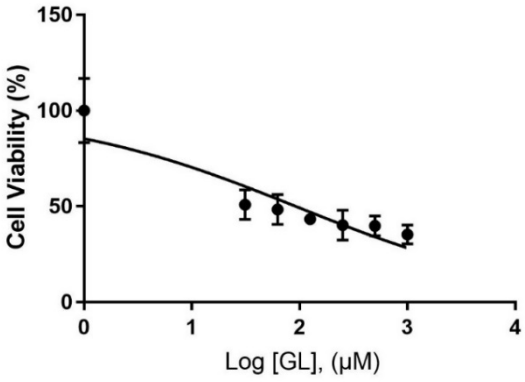
به‌منظور بررسی اثرات ضد سرطانی این روش بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون، در ابتدا سلول‌های CT26، ۲۴ ساعت قبل از تیمار، در چاهک‌های ظرف ۹۶ خانه‌ای به تعداد ۱۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت شدند. پس از رشد باکتری‌ها تا OD_{600}=0.5، سلول‌های CT26 با غلظت‌های مختلف ترکیب گلیسیریزیک اسید، باکتری (۲۰،۰۰۰ $cfuml^{-1}$) و باکتری و گلیسیریزیک اسید تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C نگهداری شدند. سپس، سلول‌ها ۳ مرتبه با محلول PBS شسته شده و به مدت ۲۴ ساعت دیگر در محیط کشت جدید حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، به‌منظور از بین بردن باکتری‌های باقی‌مانده، نگهداری شدند. در مرحله بعد، به هر چاهک معادل ۱۰٪ از حجم کل آن، محلول ($5\ \mu gml^{-1}$) MTT اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه گزاری شدند. پس از تشکیل بلورهای فورمازان، محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و به هر چاهک مقدار ۱۵۰L μ از محلول DMSO اضافه شد. درنهایت میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد.

بررسی آماری داده‌ها

به‌منظور بررسی میزان بقای رده سلولی CT26 و تعیین IC_{50}، نتایج حاصل از آزمون MTT مورد تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار Graph Pad prism 6 قرار گرفت.

نتایج و بحث

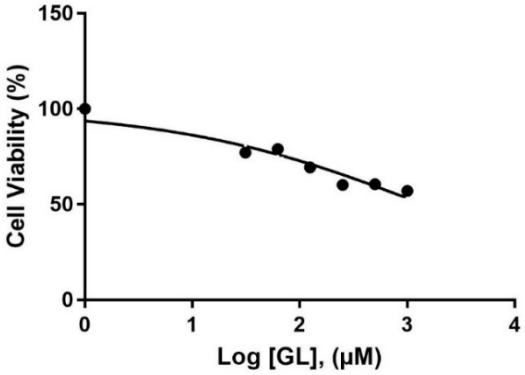
به‌منظور بررسی اثرات ضد سرطانی هم‌افزایی باکتری *E. coli* DH5α و ترکیب گلیسیریزیک اسید بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون، پس از کشت و نگهداری باکتری و سلول‌ها و انجام تیمارهای مختلف، میزان بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT مورد سنجش قرار گرفت. پس از بررسی‌های آماری و رسم نمودار دوز-پاسخ برای غلظت‌های مختلف میزان بقای سلولی تعیین شد (نمودار ۱). بر این اساس میزان IC_{50} همراهی باکتری و ترکیب گلیسیریزیک اسید معادل ۹۲/۶ میکرومولار محاسبه شد.



(نمودار ۱)

نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های CT26 تحت اثر هم‌افزایی باکتری *E. coli* DH5α و ترکیب گلیسیریزیک اسید، داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت می‌باشد.

این در حالی است که پس از رسم نمودار دوز-پاسخ برای غلظت‌های مختلف ترکیب گلیسیریزیک اسید به تنهایی، اثر مهاری بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون غلظتی بسیار بالاتر بوده و IC_{50} برابر ۱,۴۲۵ میکرومولار محاسبه شد (نمودار ۲).



(نمودار ۲)

نمودار دوز-پاسخ تیمار سلول‌های CT26 تحت اثر ترکیب گلیسیریزیک اسید،

داده‌ها میانگین سه بار تکرار درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت می‌باشد

پس از بررسی اثرات هم‌افزایی ضد سرطانی باکتری *E. coli* DH5α و ترکیب گلیسیریزیک اسید بر رشد سلول‌های رده CT26 سرطان کولون در پژوهش حاضر، مشخص شد سمیت سلولی حاصل از این هم‌افزایی نسبت به تیمار با ترکیب گلیسیریزیک اسید به تنهایی، بسیار بالاتر بوده و امید است در مطالعات آینده و آزمایش‌های حیوانی به شواهد و نتایج کاربردی‌تری برای مطالعات انسانی دست یافت.

منابع

Cheng, C.-M., Chen, F. M., Lu, Y.-L., Tzou, S.-C., Wang, J.-Y., Kao, C.-H., Cheng, T.-L., & Roffler, S. R. (2013). Expression of β-glucuronidase on the surface of bacteria enhances activation of glucuronide prodrugs. *Cancer Gene Therapy*, *20(5)*:276-81.

Cheng, C.-M., Lu, Y.-L., Chuang, K.-H., Hung, W.-C., Shiea, J., Su, Y.-C., Cheng, T.-L., & Roffler, S. R. (2008). Tumor-targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, *15*(6), 393–401.

Hsieh, Y. T., Chen, K. C., Cheng, C. M., Cheng, T. L., Tao, M. H., & Roffler, S. R. (2015). Impediments to enhancement of CPT-11 anticancer activity by E. coli directed beta-glucuronidase therapy. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–23.

Khan, R., Khan, A. Q., Lateef, A., Rehman, M. U., Tahir, M., Ali, F., & Sultana, S. (2013). Glycyrrhizic Acid Suppresses the Development of Precancerous Lesions via Regulating the Hyperproliferation, Inflammation, Angiogenesis and Apoptosis in the Colon of Wistar Rats. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–22.

Lehouritis, P., Springer, C., & Tangney, M. (2013). Bacterial-directed enzyme prodrug therapy. *Journal of Controlled Release*, *170*(1), 120–131.

Nemunaitis, J., Cunningham, C., Senzer, N., Kuhn, J., Cramm, J., Litz, C., & Sznol, M. (2003). Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Therapy*, *10*, 737–744.

Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D. P., Prakash, A., Medhi, B., & Das, B. (2010). Open Access REVIEW Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, *17(1)*:21.

Stritzker, J., Pilgrim, S., Szalay, A. A., & Goebel, W. (2008). Prodrug converting enzyme gene delivery by L. monocytogenes. *BioMed Central Cancer*, *8*, 94.

Zu, C., & Wang, J. (2013). Tumor-colonizing bacteria: a potential tumor targeting therapy. *Critical Reviews in Microbiology*, *40*(3), 225–35.

Evaluating of the Synergistic Anticancer Effects of *E. coli* DH5α and Glycyrrhizic Acid Compound on Growth of CT26 Colon Cancer Cells

Amin Afkhami Poustchi[1], Mehrdad Iranshahi[2, 3], Mansour Mashreghi[1, 4], Hossein S. Moradi[1], Maryam M. Matin[1, 4, 5,*]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Pharmacognosy, Faculty of pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad Iran
4. Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
5. Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

Email: a.afkhami.p@mail.um.ac.ir

Abstract

Cancer remains one of the most deadly diseases worldwide with the number of cases steadily increasing. Advances in our understanding of cancer biology offer a series of new treatment options called experimental cancer therapies, which intend or claim to treat cancer by improving, supplementing or replacing conventional methods. One of these approaches is bacterial cancer therapy. An exciting approach to increase the efficacy of a bacterial vector and reduce its therapeutic dosage is the use of bacteria with a prodrug converting enzyme and using them to deliver the enzyme to the locality of the tumor. Glycyrrhizic acid (GL), a glucuronide compound extracted from licorice roots, has been shown as a potent anti-cancer agent with possible effects on cancer cells through various routes. *E. coli* expressing β-glucuronidase can selectively colonize in solid tumors and convert glucuronide compounds to cytotoxic agents specifically at the tumor site. In the present study, for the first time, we examined the anticancer effects of a combination of *E. coli* DH5α bacteria and various concentrations of GL on CT26 colon carcinoma cells. The IC_{50} values of combination for bacteria and GL and also GL alone were determined as 92.6 µM and 1,425 µM, respectively. Our data indicated that simultaneous use of these two therapeutic agents has a much stronger inhibitory effect on the growth of CT26 colon cancer cells than treatment with GL alone. In the next steps, the results will be confirmed in animal studies.

Keywords: Bacterial Tumor Therapy, Anti-inflammatory Agents, Glycyrrhizic Acid, *E. coli*, Colon Cancer