مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهمن ۱۳۹۷، دوره ۷۶، شماره ۱۱، صفحه‌های ۷۲۴ تا ۷۳۰

مقاله اصیل

بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس کازیی* PTCC 1608 بر روی بیان ژن‌های TLR2 و TLR4 در سلول‌های HT29 عفونی شده با *سالمونلا انتریتیدیس*

محمد مهدی سلطان‌دلال[۱و۲*]
منا مشیری[۱]، عباس میرشفیعی[۳]
معصومه دورقی[۱]، فرهاد رضایی[٤]
مهرداد غلامی[٥]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
٤- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
٥- گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی.
تلفن: ۸۸۹۹۲۹۶۷۱-۰۲۱
E-mail: msoltandallal@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۲ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

زمینه و هدف: گونه‌های لاکتوباسیلوس به‌دلیل داشتن توانایی تعدیل پاسخ‌های ایمنی در انسان و اثرات درمانی در اختلالات التهابی، به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات استرین‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس بر روی بیان ژن‌های TLR2, TLR4 در رده‌ی سلول‌های سرطان کولون (HT-29) عفونی شده با *سالمونلا انتریتیدیس* بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از فروردین تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در این مطالعه از دو سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس کازیی* PTCC 1608 استفاده شد. سلول‌های HT29 کشت داده شدند و سپس این سلول‌ها پیش و پس از چالش با پاتوژن، توسط سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس تیمار شدند. پس از استخراج RNA تام از سلول‌ها و سنتز cDNA، توانایی لاکتوباسیلوس‌ها در تعدیل بیان ژن‌های TLR-2 و TLR-4 توسط روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان داد که پس از تیمار سلول‌های سالم و غیرعفونی HT29، با هر یک از دو باکتری پروبیوتیک، بیان ژن‌های TLR2-4 به‌طور چشمگیری افزایش داشت. برخلاف آن، میزان بیان این دو ژن در سلول‌های آلوده به *سالمونلا انتریتیدیس*، پیش و پس از درمان با هر یک از باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازیی* به‌صورت معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی دارای اثر چشمگیر ضدالتهابی در برابر بیماری‌زایی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* هستند. اما در این مطالعه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* فعالیت ضد التهابی قوی‌تری را نسبت به *لاکتوباسیلوس کازیی* از خود نشان داد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازیی*، پروبیوتیک، *سالمونلا انتریتیدیس*، گیرنده‌های شبه Toll.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی متشکل از میکروارگانیسم‌های همسفره زنده هستند که پس از هضم، سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشد و مزایای زیادی برای میزبان به‌همراه دارد. از جمله‌ی این مزایا می‌توان به تولید متابولیت‌های متعدد ضد میکروبی، ممانعت رقابتی روده‌ای در مقابل پاتوژن‌ها، کمک به تعادل فلور میکروبی روده، خنثی‌سازی کارسینوژن‌های مربوط به رژیم غذایی، فعالیت ضد سرطان کولون، نقش در اختلالات تنفسی و علایم آلرژیک، خاصیت ضد التهابی، افزایش وظایف دفاعی، مدولاسیون و هدایت سیگنال‌های سلول‌های اپی‌تلیال و تعدیل پاسخ ایمنی ذاتی و تطبیقی اشاره کرد.[۱و۲] این میکروارگانیسم‌های زنده که به‌عنوان پروبیوتیک مصرف می‌شوند،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

کارآیی درمانی زیادی برای انسان به‌همراه دارند، به‌طوری‌که در درمان اسهال ناشی از باکتری‌های پاتوژن روده‌ای مانند سالمونلا، کولیت وابسته به آنتی‌بیوتیک، بیماری عدم تحمل لاکتوز، سندرم روده‌ی تحریک‌پذیر و سرطان‌های کولون نقش دارند.[۳و۴] نقش پروبیوتیک‌ها در تعدیل پاسخ ایمنی می‌تواند به‌علت تاثیر این میکروارگانیسم‌های مفید زنده روی ترشح بعضی سایتوکین‌ها و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ذاتی باشد.[۵و۶] نوع اثر پروبیوتیک، به تولید متابولیت‌های فعال از نظر بیوشیمیایی آن‌ها یا مولکول‌های موجود بر سطح این میکروارگانیسم‌ها یا اجزای مترشحه از آن‌ها بستگی دارد. بنابراین اثرات پروبیوتیک‌ها را به محصولات حاصل از تخمیر میکروارگانیسم‌ها مانند پپتیدها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده در طی تخمیر آن‌ها و ترکیبات دیواره‌ی سلولی و پپتیدوگلیکان و هر بخشی از باکتری حتی DNA نسبت می‌دهند.[۷-۹]

TLRها یک نوع از ۱۰ نوع پروتیین‌های ترانس ممبران انسانی هستند که به‌عنوان گیرنده‌های شناسایی الگو (Pattern recognition receptors, PRR) شناخته می‌شوند و نقش ضروری در سیستم ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. این رسپتورها به‌وسیله‌ی بیشتر سلول‌های ایمنی و سلول‌های اپی‌تلیال بیان می‌شوند.[۱۰] این رسپتورها به‌طور طبیعی موتیف‌های مولکولی حفاظت‌شده (الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن)ی مولکول‌های عفونی را شناسایی می‌کنند.[۱۱] تاکنون ۱۳ نوع TLR شناسایی شده است که از بین آن‌ها TLR2,4,5,9 مهم‌تر هستند. TLR2 لیپوپلی‌ساکارید، گلیکولیپید و موتیف‌های پپتیدوگلیکان را در دیواره‌ی سلولی شناسایی می‌کند. TLR4 نیز شناسایی لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های گرم منفی را بر عهده دارد.[۱۲و۱۳]

سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس، باسیل گرم منفی و یکی از باکتری‌های خانواده‌ی انتروباکتریاسه است که از معمول‌ترین سروار سالمونلا در ایجاد عفونت، در جهان بشر به‌شمار می‌رود. این باکتری علت اصلی بیماری منتقله از راه غذا در طی دهه‌ی اخیر به‌شمار می‌رود که در تمام سطح جهان جدا شده است. در حقیقت عفونت *سالمونلا انتریتیدیس* یک مشکل بزرگ و چشمگیر در سلامت عمومی به‌شمار می‌آید.[۱۴و۱۵] همان‌طور که بیان شد *سالمونلا انتریتیدیس* باسیل گرم منفی بدون فلاژل است و به‌همین دلیل TLR2,4 نقش مهم و ضروری در شناسایی آن و فعال‌سازی سیستم ایمنی ذاتی در انسان پس از مواجهه با این باکتری برعهده دارند. همچنین سایتوکین‌های تولیدشده پس از عفونت *سالمونلا انتریتیدیس* شامل سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضد التهابی و کموکین‌های زیادی می‌باشد که در دفاع بدن در برابر این پاتوژن نقش بسزایی دارند.[۱۶و۱۷]

هدف از انجام پژوهش کنونی، بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643، *لاکتوباسیلوس کازیی* PTCC 1608 بر روی رده سلولی سرطان کولون (HT29) در چالش با *سالمونلا انتریتیدیس* و آنالیز بیان ژن‌های TLR2,4 در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین تا اسفند ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران انجام شد. در این مطالعه ار دو پروبیوتیک با منشا بومی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس کازیی* PTCC 1608) (مرکز کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر زیستی ایران) استفاده شد. هر دو این سویه‌ها برای بهبود رشد و غنی‌سازی، روی محیط براث de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) کشت داده شدند و سپس به‌مدت ۲٤ ساعت و با وجود مکمل ۰/۰۵٪ سیستیین و در گرمخانه ۳۷ °C، گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن با استفاده از Phosphate-buffered saline (PBS) مقدار 10^7 CFU سوسپانسیون از باکتری‌ها تهیه شد. همچنین سویه پاتوژن مورد استفاده در این مطالعه *سالمونلا انتریکا* سروار انتریتیدیس بود که پس از انجام کشت سویه یادشده در محیط‌های گزیلوز-لیزین-دزوکسی کولات آگار (XLD) و هکتون انتریک آگار (HE) و انجام تست‌های افتراقی این سویه روی محیط‌های افتراقی KIA agar، سیمون سیترات، اوره، MR-VP و SIM دوباره تایید هویت شد. سپس یک کلنی تک، از ایزوله‌ی *سالمونلا انتریتیدیس* که در محیط LB agar کشت داده شده بود، در ۵ ml محیط LB براث در شرایط هوازی برده شد و پس از آن به‌مدت ۱٦ ساعت همراه با Shaking در دمای ۳۷ °C انکوبه شد تا پیش از استفاده، غنی‌سازی و رسیدن به فاز لگاریتمی در این باکتری صورت گیرد.

رده‌ی سلول‌های سرطانی کولون (HT29) از بانک سلولی (Institute of Pasture, Tehran, Iran) خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ °C و رطوبت ۵٪ به‌مدت ۲۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

ساعت قرار داده شدند. سلول‌های HT29، در چهار پلیت متفاوت و به‌صورت Triplicate، با رقت CFU/ml 10^7 از *سالمونلا انتریتیدیس* که به‌وسیله‌ی PBS تهیه شده بود، مجاور و به‌عبارتی عفونی شده، و پس ازآن غلظت CFU/ml 10^7 از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در هر یک از زمان های (صفر، دو و چهار ساعت پس از ایجاد عفونت) به سه عدد از چاهک‌ها اضافه گردید.

RNA total سلول‌های HT29، پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری (در حضور ۵٪ CO_2 و فشار ۹۵٪ اتمسفر) برای سنجش کمی میزان بیان ژن TLR2,4 با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA، استخراج شده و پس از آن با استفاده از کیت سنتز (Complementary DNA, CDNA) به CDNA تبدیل شده و در نهایت ژن‌های یادشده برای quantitative Real-time PCR (qRT-, PCR) آماده و اندازه‌گیری انجام گردید. در ضمن در این مطالعه از ژن بتا اکتین که در همه‌ی سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد به‌عنوان ژن پایه و کنترل استفاد گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده برای Real-time PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

بدین‌ترتیب پس از درمان سلول‌های HT29 آلوده با *سالمونلا انتریتیدیس*، با پروبیوتیک‌های مذکور میزان کمی بیان ژن TLR2,4 در سطح mRNA در هر یک از زمان‌های در نظر گرفته شده، بررسی و با هم مقایسه شده و تاثیر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *کازیی* در زمان‌های مختلف روی آن مشخص شد. در نهایت نتایج حاصل با توجه به بررسی و تحلیل‌های آماری بیان می‌شوند.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از SPSS software, version 21 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) استفاده شد. نتایج داده‌های کمی براساس میانگین سه بار تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت. P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از آنکه سلول‌ها در پلیت سلولی شمارش شدند، پس از گذشت سه روز انکوباسیون و پیش از انجام هر کاری پلیت کشت سلولی مورد نظر در زیر میکروسکوپ وارونگر مشاهده شد تا سلول‌ها از لحاظ مورفولوژیکی بررسی و دیده شوند که یافته‌ها نشانگر عدم وجود آلودگی در چاهک‌ها بود (شکل ۱).

بررسی تغییرات بیان ژن TLR2 پس از شش ساعت نشان داد که وقتی سلول‌های عفونی نشده با پاتوژن، با سویه‌های پروبیوتیکی مواجه شدند، بیان TLR2 به‌صورت معنادار (P<۰/۰۵) افزایش یافت. که این افزایش نشانگر ایمنی‌زا بودن این دو سویه پروبیوتیکی بود. این افزایش بیان در TLR4 نسبت به TLR2 با شدت کمتری دیده شد.

اما سلول‌های HT29 ای که از پیش با دو باکتری پروبیوتیکی تیمار شده بودند، پس از آلوده شدن با *سالمونلا انتریتیدیس* در مدت زمان دو و چهار ساعت، کاهش معناداری در میزان بیان ژن TLR2 از خود نشان دادند (P<۰/۰۵)، اگرچه این کاهش در سلول‌های تیمار شده با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به سلول‌های تیمار شده با *لاکتوباسیلوس کازیی*، شدت بیشتری داشت. در مورد TLR4 هم همین نتایج دیده شد، اما کاهش در بیان ژن TLR2 نسبت به TLR4 بیشتر بود.

سلول‌های HT29 که از پیش با *سالمونلا انتریتیدیس* عفونی شده بودند،

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای Real time PCR

ژن	توالی پرایمر	دمای آنیلینگ	رفرانس
TLR2	۵-GCA GAA GCG CTG GGG AAT GG-'۳ ۵-GGA TGC CTA CTG GGT GGA GAA-'۳	۵٤	۱۳
TLR4	۵ GGT GGA AGT TGA ACG AAT GG '۳ ۵ CCA GCA AGA AGC ATCAGG TG '۳	۵۳	۱۳
β-actin	۵ GCTCTGGCTCCTAGCACCAT '۳ ۵ GCCACCGATCCACACAGAGT '۳	۵۵	۱۸

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

شکل ۱: تصویر میکروسکوپی سلول HT29، پس از کشت سلولی

پس از درمان با *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌مدت دو و چهار ساعت، کاهش معناداری در میزان بیان TLR2 نشان دادند (P<۰/۰۵) که این کاهش در زمان انکوباسیون چهار ساعت نسبت به انکوباسیون دو ساعته و در درمان با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت به *لاکتوباسیلوس کازیی* با شدت بیشتری مشاهده شد. در مورد TLR2 هم نتایج به‌همین صورت بود، با این تفاوت که این میزان کاهش در بیان ژن TLR2 بیشتر از TLR4 بود.

بحث

امروزه با توجه به عوارض زیاد داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، نقش بسزای پروبیوتیک‌ها در درمان بسیاری از عفونت‌ها یکی از پر ابهام‌ترین و داغ‌ترین مسایل روز پزشکی به‌شمار می‌رود.[۱۹]

در مطالعه‌ای که Ganguli و همکاران انجام دادند، بیان ژن‌های TNFα, IL 1β, IL8 در روده‌ی جنین انسان که در مجاورت با باکتری زنده‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوس* GG قرار گرفته بود، به‌وسیله‌ی q PCR اندازه‌گیری شد. آن‌ها مشاهده کردند که *لاکتوباسیلوس رامنوس* GG به‌طور معناداری تولید سایتوکین‌های التهابی در پاسخ به باکتری‌های پاتوژن و سیگنال‌های پیش‌التهابی را در سلول‌های اپی‌تلیال روده‌ی جنین انسان کاهش می‌دهد.[۲۰] در مطالعه‌ای که توسط Finamore و همکاران انجام گرفت، آن‌ها سلول‌های Caco-2 را با انتروتوکسیژنیک *اشرشیاکلی*، *لاکتوباسیلوس رامنوس* و سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس رامنوس*، هر کدام به‌تنهایی و در مجاورت با هم، تحت درمان قرار دادند و تاثیر آن‌را روی مسیر سیگنالینگ TLR4 مورد بررسی قرار دادند. آنالیز حاصل از وسترن بلات نشان داد که *لاکتوباسیلوس رامنوس* فعالیت مسیرهای مختلف سیگنالینگ TLR4 را در سلول‌های Caco-2 سرکوب می‌کند.[۲۱]

در مطالعه‌ای که توسط Bermudez-Brito و همکاران انجام گرفت، آن‌ها برای بررسی اثرات ایمنولوژیکی یفیدوباکتریوم بِرِوه CNCM-4035 روی سلول‌های دندریتیک روده‌ی انسانی در پاسخ به *سالمونلا تیفی*، این سلول‌ها را با سالمونلا عفونی کرده و سپس در طی یک آزمایش، آن‌ها را با باکتری زنده‌ی پروبیوتیک و در آزمایش دیگر آن‌ها را با سوپرناتانت، مجاور کرده و پس از انکوباسیون، ترشح سایتوکین‌ها را به‌وسیله‌ی الایزا و بیان ژن‌های TLR را توسط Real-time RT PCR آنالیز کردند. نتایج حاکی از آن بود که سوپرناتانت در دندریتیک سل‌های روده‌ی انسان در چالش با *سالمونلا تیفی*، باعث کاهش در مقدار IL-6,12 شده اما بیفیدوباکتریوم زنده القاکننده‌ی قوی‌تری برای IL 6,8,10 بود. از طرف دیگر CFS باعث برگرداندن سطح TGFβ به حالت اول در حضور سالمونلا شد. همچنین مشخص شد که بیفیدوباکتریوم زنده باعث افزایش TLR2,4,9 در حضور سالمونلا شده ولی سوپرناتانت آن TLR1,2,5,9 را افزایش می‌دهد. البته نتایج نشان داد که افزایش TLR9 به‌وسیله‌ی سوپرناتانت بیشتر بود.[۲۲]

در مطالعه‌ای که توسط Castillo و همکاران انجام شد، نقش *لاکتوباسیلوس کازیی* در جلوگیری از عفونت *سالمونلا تیفی موریوم* در موش BALB/c بررسی شد. بررسی و اندازه‌گیری سایتوکین‌ها در روزهای مختلف پس از درمان با پروبیوتیک‌ها و به‌روش ایمونوهیستوشیمی، نشان داد که تزریق پروبیوتیک به موش سالم، بیان ژن‌های TLR2,4,9 را افزایش داده و باعث افزایش تولید و ترشح IL10, TNFα, IFNγ در پلاک‌های پیر می‌شود. اما پس از عفونت با *سالمونلا تیفی موریوم* و به‌دنبال تزریق دوباره‌ی پروبیوتیک، میزبان به‌وسیله‌ی مدولاسیون پاسخ التهابی، حمایت شده و سطح TNFα کاهش یافته و تولید INFγ, IL6, IL10 در لامینا پروپریای روده‌ی کوچک افزایش داشت.[۲۳]

در مطالعه‌ای که توسط Malago و همکاران انجام شد، آن‌ها ابتدا سلول‌های Caco2 آدنوکارسینومای انسانی را با *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌عنوان پروبیوتیک درمان کردند. در مرحله‌ی بعدی آن‌ها به‌صورت جداگانه این سلول‌ها را با *سالمونلا انتریتیدیس* عفونی کردند و در آزمایش سوم این دو پروبیوتیک و *سالمونلا*

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

انتریتیدیس را با هم روی Caco2 cell کشت دادند و در مرحله‌ی آخر این پژوهشگران *سالمونلا انتریتیدیس* و سوپرناتانت را با هم روی این سلول‌ها کشت دادند و پس از آن سطح IL-8 در هر یک از آزمایشات را توسط الایزا و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار دارند. نتایج نشان داد که *سالمونلا انتریتیدیس* و هر کدام از لاکتوباسیلوس‌ها به‌تنهایی یک افزایش وابسته به دوز در سطح IL-8 را از خود نشان دادند. اما هیچ‌یک از این دو پروبیوتیک‌ها اثری روی رشد IL-8 القا شده توسط سالمونلا نداشتند، ولی سوپرناتانت آن‌ها باعث کاهش چشمگیری در سطح IL-8 القا شده توسط *سالمونلا انتریتیدیس* گردید.[۲۴]

در مطالعه‌ای که توسط Nandakumar و همکاران انجام شد، ایزوله‌های کلینیکی *سالمونلا تیفی موریوم* از بیماران، جدا شده و به کشت سلول HT29 تزریق شد. سپس سلول‌های عفونی شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* درمان شدند. این پژوهشگران به‌وسیله‌ی الایزا سطح IL-8 و دیگر کموکین‌ها مانند CXCLI, CXCL5, CCL5 را اندازه‌گیری کردند. سطح بیان mRNAی TLR2,4,5,9 و CXCLI, CXCL5, CCL5 هم به‌وسیله‌ی روش Quantitative real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج بدین‌صورت بود که میزان ترشح IL-8 القا شده توسط این باکتری در HT29 افزایش یافت اما درمان این سلول‌ها با لاکتوباسیلوس به‌تنهایی، اثر افزایشی روی ترشح IL-8 نداشت. لاکتوباسیلوس‌ها پاسخ اینترلوکین هشت القا شده توسط *سالمونلا تیفی موریوم* را در سلول‌های HT29 مهار کردند. نتایج آزمایشات دیگر نشان دادند که *سالمونلا تیفی موریوم* بیان mRNAی TLR4 را در سطح سلول‌های HT29 تنظیم مثبت کرد و با اضافه کردن لاکتوباسیلوس‌ها افزایش بیان در این ژن‌ها دیده شد. سطح TLR2,5,9 با حضور *سالمونلا تیفی موریوم* به‌طور چشمگیری افزایش یافت.[۲۵]

آنالیز و بررسی‌های حاصل از Real-time PCR نشان داد که وقتی سلول سالم HT29 با *سالمونلا انتریتیدیس* مواجه و شش ساعت انکوبه شد، LPS دیواره‌ی سلولی این باکتری به این گیرنده‌های غشایی خود در سطح روده (HT-29) متصل شده و سلول HT29 میزان بیان ژن TLR2,4 خود را نسبت به حالت عادی افزایش داد. تا بدن ایمنی خود را افزایش داده، سایتوکین‌های ایمنی تولید و بدن با عامل عفونی مقابله کند.

اندازه‌گیری نسبی بیان TLR2 و نتایج آنالیز داده‌های مربوط به بیان این ژن، پس از شش ساعت انکوباسیون، نشان داد که وقتی این سلول‌های سالم با دو پروبیوتیک یادشده درمان شدند، بیان این ژن به‌طور چشمگیری بالاتر رفت و تفاوت معناداری حاصل شد، در حقیقت این افزایش معنادار نشان‌دهنده‌ی خواص ایمنی‌زا بودن و نقش افزایشی این دو پروبیوتیک برای تقویت سیستم ایمنی و نقش تنظیمی مثبت این دو است. اما این افزایش معنادار در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به لاکتوباسیلوس کازیی بیشتر دیده شد که گویای تاثیر بیشتر ایمنی‌زایی این پروبیوتیک است. ژن TLR2 همان‌طور که گفته شد از خانواده‌ی PRRها و یک ژن دخیل در سیستم ایمنی ذاتی است و این بدین معناست که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و به‌مقدار کمتری لاکتوباسیلوس کازیی سیستم ایمنی ذاتی را تقویت می‌کند تا قدرت مقابله‌ی بدن بر علیه عامل عفونی وارد شده افزایش یابد.

نتایج بالا در مورد ژن TLR2، در مورد بیان ژن TLR4 هم صدق می‌کرد با این تفاوت که چگونگی نقش درمانی این دو پروبیوتیک، با کاهش بیان ژن TLR2 نقش پررنگ‌تری دارد. به‌عبارت دیگر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *کازیی* بر روی بیان ژن TLR2 اثر کاهنده‌ی بیشتری نسبت به ژن TLR4، در سلول‌های عفونی با *سالمونلا انتریتیدیس* دارد.

پس از مقایسه‌ی نتایج مطالعات صورت‌گرفته‌ی پیش که در بالا به آن‌ها اشاره شد و نتایج حاصل از این مطالعه، مشخص شد که نتایج، به‌صورت کاملا هماهنگی با هم همخوانی داشتند.

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی، پروبیوتیک‌های بومی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 و *لاکتوباسیلوس کازیی* PTCC 1608 دارای اثر چشمگیر ضدالتهابی در برابر بیماری‌زایی باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* هستند. اگرچه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC1643 فعالیت ضدالتهابی قوی‌تری را نسبت به *لاکتوباسیلوس کازیی* در این مطالعه از خود نشان داد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثر سویه‌های بومی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس کازیی PTCC 1608 بر روی بیان ژن TLR2,4 در HT29 intestinal epithelial cell در چالش با سالمونلا انتریتیدیس در شرایط آزمایشگاهی" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به‌شماره ۲۶۶۲۷ می‌باشد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

References

1. Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006;7(2):73-89.
2. Karamese M, Aydin H, Sengul E, Gelen V, Sevim C, Ustek D, et al. The immunostimulatory effect of lactic acid bacteria in a rat model. *Iran J Immunol* 2016;13(3):220-8.
3. Korterink JJ, Ockeloen L, Benninga MA, Tabbers MM, Hilbink M, Deckers-Kocken JM. Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* 2014;103(4):365-72.
4. Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* 2011;17(6):369-74.
5. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Ñahui Palomino RA, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-candida activity. *PLoS One* 2015;10(6):e0131220.
6. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, et al. Lactobacillus gasseri SBT2055 induces TGF-β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One* 2014;9(8):e105370.
7. Kuugbee ED, Shang X, Gamallat Y, Bamba D, Awadasseid A, Suliman MA, et al. Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer. *Dig Dis Sci* 2016;61(10):2908-2920.
8. Zavala L, Golowczyc MA, van Hoorde K, Medrano M, Huys G, Vandamme P, et al. Selected Lactobacillus strains isolated from sugary and milk kefir reduce Salmonella infection of epithelial cells in vitro. *Benef Microbes* 2016;7(4):585-95.
9. Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007;118(3):264-73.
10. Sharifi L, Aghamohammadi A, Mohsenzadegan M, Rezaei N, Zavareh FT, Moshiri M, et al. Immunomodulation of TLR2 and TLR4 by G2013 (Î±-L-Guluronic acid) in CVID patients. *Int J Pediatr* 2017;5(7):5327-37.
11. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 2004;34(2):73-82.
12. Sharifi L, Mohsenzadegan M, Aghamohammadi A, Rezaei N, Zavareh FT, Bokaie S, et al. Immunomodulatory effect of G2013 (α-L-Guluronic acid) on the TLR2 and TLR4 in human mononuclear cells. *Curr Drug Discov Technol* 2018;15(2):123-31.
13. Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT; Microbiology and Gut Biology Group; Tayside Tissue and Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 2005;115(4):565-74.
14. Eshraghi S, Soltan Dalall M M, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B, et al . Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. *Tehran Univ Med J* 2010;67(12):876-82.
15. Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* 2008;198(1):109-14.
16. Moshiri M, Dallal MMS, Rezaei F, Douraghi M, Sharifi L, Noroozbabaei Z, et al. The Effect of Lactobacillus acidophilus PTCC 1643 on Cultured Intestinal Epithelial Cells Infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Osong Public Health Res Perspect* 2017;8(1):54-60.
17. Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect* 2001;3(14-15):1191-200.
18. Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S, et al. Dampening of death pathways by schnurri-2 is essential for T-cell development. *Nature* 2011;472(7341):105-9.
19. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):123-9.
20. Ganguli K, Collado MC, Rautava J, Lu L, Satokari R, von Ossowski I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res* 2015;77(4):528-35.
21. Finamore A, Roselli M, Imbinto A, Seeboth J, Oswald IP, Mengheri E. Lactobacillus amylovorus inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic Escherichia coli via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal Caco-2 cells and pig explants. *PLoS One* 2014;9(4):e94891.
22. Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, et al. Cell-free culture supernatant of Bifidobacterium breve CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with Salmonella typhi through TLR activation. *PLoS One* 2013;8(3):e59370.
23. Castillo NA, Perdigón G, de LeBlanc AdM. Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* 2011;11(1):177.
24. Malago J, Tooten P, Koninkx J. Anti-inflammatory properties of probiotic bacteria on Salmonella-induced IL-8 synthesis in enterocyte-like Caco-2 cells. *Benef Microbes* 2010;1(2):121-30.
25. Nandakumar N, Pugazhendhi S, Ramakrishna B. Effects of enteropathogenic bacteria & lactobacilli on chemokine secretion & Toll like receptor gene expression in two human colonic epithelial cell lines. *Indian J Med Res* 2009;130(2):170-8.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2019; Vol. 76, No. 11: 724-730 Original Article

Evaluation of the effect of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 on the TLR2 and TLR4 expression in HT29 cells infected with *Salmonella enteritidis*

Mohammad Mehdi Soltan Dallal Ph.D.[1,2*]
Mona Moshiri M.Sc.[1]
Abbas Mirshafiey Ph.D.[3]
Masoumeh Douraghi Ph.D.[1]
Farhad Rezaie Ph.D.[4]
Mehrdad Gholami Ph.D.[5]

1- Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5- Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

* Corresponding author: Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Qods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98 21 88992971
E-mail: msoltandallal@gmail.com

Abstract

Received: 23 May 2018 Revised: 30 May 2018 Accepted: 09 Feb. 2019 Available online: 19 Feb. 2019

Background: Probiotics are living organisms that are beneficial for human health. *Lactobacillus* species has been considered as probiotic bacteria due to their adjustment of human immune responses and therapeutic effects in inflammatory disorders. The aim of the present study was to evaluate the effects of *Lactobacillus* probiotic strains on toll-like receptors (TLR2 and TLR4) expression in HT29 cell line (a human colon cancer cell line) infected with *S. enteritidis*.

Methods: This experimental study was done in Food Microbiology Research Center of Tehran University of Medical Sciences, Iran, from March 2016 to February 2017. In this study, two strains of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 were used. HT29 cells were cultured in RPMI medium containing fetal bovine serum and antibiotics. Then, the cells were treated with the *Lactobacillus* strains, after or before challenge with *S. enteritidis*. After total RNA extraction and cDNA synthesis, the capacity of probiotic lactobacilli to modulate TLR2 and TLR4 expression on treated and un-treated HT29 cells were assessed quantitatively using Real-time polymerase chain reaction technique with specific primers.

Results: Our findings indicated that after treatment of non-infected HT29 cells, with both the probiotics, the expression of TLR2 and TLR4 genes significantly increased. In contrast, the expression of these two genes in HT29 cells which were infected with *S. Enteritidis* was significantly reduced before and after treatment with each one of the probiotic bacteria. The anti-inflammatory effect of probiotic lactobacilli on *S. enteritidis* were confirmed in tests. This study showed that *L. acidophilus* and *L. casei* play a major role in boosting the innate immune responses, the TLR2 and TLR4 expression levels also decreased, pre and post-infection with *S. enteritidis.*

Conclusion: According to the results, both *Lactobacillus* strains have remarkable anti-inflammatory effect in pathogenicity of *S. enteritidis*, but *L. acidophilus* display greater anti-inflammatory activity than *L. casei* in this work. Additional in vivo and in vitro studies are required to further elucidate the mechanisms underlying this anti-inflammatory effect.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, probiotics, *Salmonella enteritidis*, toll-like receptors.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-15]