

สัญญาเลขที่ MRG4680071

โครงการ การสร้างแบคทีเรียในลำไส้ที่สามารถผลิตสารแลคโตเฟอร์รินและผลต่อการป้องกันการเกิด มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับสารเอชอกซีมีเทน

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้สร้างแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. lactis* ที่สามารถสร้างแลคโตเฟอร์รินโดยใช้ยีนแลคโตเฟอร์ริน ขนาด 1200, 600 และ 133 คู่เบสเข้าไปโดยใช้พลาสมิด pBE31 ได้ สายพันธุ์ LF001, LFN002 และ LFC003 และเพื่อให้มีการสร้างแลคโตเฟอร์รินที่สร้างออกมาในน้ำเลี้ยงจึงใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินส่วน N-lobe ขนาด 600 คู่เบสเข้าไปโดยใช้พลาสมิด pAMJ2008 ได้ สายพันธุ์ ALFN เมื่อตรวจสอบการแสดงออกโดย Western blot analysis โดยใช้ anti-human lactoferrin antibodies พบว่าสามารถตรวจวัดโปรตีนแลคโตเฟอร์รินได้ในสายพันธุ์ *L. lactis* LF001 แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในอีกสองสายพันธุ์ และไม่สามารถตรวจหาโปรตีนในน้ำเลี้ยงได้ เมื่อดูการแสดงออกของยีนโดยการวัดการสร้าง mRNA จากยีนแลคโตเฟอร์ริน โดยใช้ cDNA probe ของยีนแลคโตเฟอร์ริน พบว่ามีการแสดงออกใน *L. lactis* สายพันธุ์ LF001 และ ALFN เท่านั้น จึงใช้สองสายพันธุ์นี้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านรอยโรคเริ่มต้นของการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาว

เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านรอยโรคเริ่มต้นก่อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ (aberrant crypt foci ; ACF) ในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ไดเมทิลไฮดราซีน (dimethylhydrazine; DMH) ในระยะเริ่มต้น พบว่าหนูที่ได้รับ *L. lactis* จะมีจำนวน aberrant crypt foci มากกว่าหนูที่ได้รับเฉพาะ saline และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *L. lactis* ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินเข้าไป (LF001 และ ALFN) พบว่าสามารถลดจำนวน ACF ได้เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะพลาสมิด (BE31 และ AMJ2008 ตามลำดับ) และยังสามารถลดจำนวน ACF ที่มีขนาดมากกว่า 3 Ac/f โดยเฉพาะหนูที่ได้ *L. lactis* สายพันธุ์ ALFN สามารถลดจำนวน ACF และ ACF ที่มีมากกว่า 3 Ac/f ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อวัดปริมาณแอโรบิคแบคทีเรียในอุจจาระของหนูที่ได้รับแบคทีเรียของแต่ละสายพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ซึ่งกลไกการป้องกันการเกิด ACF ในหนูขาวที่ได้รับไดเมทิลไฮดราซีน จะได้มีการศึกษาต่อไป

เมื่อทดสอบในระยะส่งเสริม *L. lactis* ที่ใส่ยีนแลคโตเฟอร์รินเข้าไป (LF001 และ ALFN) มีแนวโน้มที่จะลดจำนวน ACF และ ACF ที่มีขนาดมากกว่า 3 Ac/f ได้เมื่อเทียบกับ *L. lactis* ที่ใส่เฉพาะพลาสมิด (BE31 และ AMJ2008 ตามลำดับ) แต่ไม่พบว่ามีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: Colon cancer prevention, *Lactococcus lactis*, lactoferrin

Abstract

In this study, we constructed lactoferrin-producing, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* by introducing several size lactoferin genes (1200 bp, 6000 bp and 133 bp) to *L. lactis* MG1363 using pB31 plasmid generated strain LF001, LFN002, LFC003 respectively. To increase the production of lactoferrin in culture media, 600 bp of N-lobe LF gene was inserted to pAMJ2008 generated ALFN. The recombinant lactoferrin was detected by Western blot analysis using anti-human antibodies. The recombinant lactoferrin was only detectable in the cell of *L. lactis* LF001 but not in other strains and culture supernatant. However, the mRNA expression human lactoferrin or fragment was detected in strain LF001 and ALFN by Northern blot hybridization with N-lobe *hLF* cDNA probe. Therefore, we selected *L. lactis* LF001 and ALFN for anti-colon carcinogenesis determination.

We determined the modulating effect of *L. lactis* LF001 and ALFN on the aberrant crypt foci formation in colon of rat received colon carcinogen, dimethylhydrazine; DMH. The results showed that rat received *L. lactis* exhibited the high number of ACF when compared to control (saline) group. In initiation stage *L. lactis* harboring lactoferrin gene (LF001 and ALFN) can decrease the number of ACF and ACF which has more than 3 Ac/f in DMH treated rat colon compared to *L. lactis* harboring each empty vector (BE31 and AMJ2008, respectively). The rat received *L. lactis* LFN exhibited the significantly low number of ACF and ACF which has more than 3 Ac/f compared to strain AMJ2008 ($p < 0.05$). In addition, there was no significantly different between the number aerobic bacteria from feces of rat treated with DMH treated and *L. lactis* each strain in the initiation stage. The mechanisms of modulating effects of lactoferrin producing *L. lactis* on DMH induced colon carcinogenesis would be further study.

In the promotion stage, *L. lactis* harboring lactoferrin gene (LF001 and ALFN) trended to decrease the number of ACF an ACF which has more than 3 AC/f when compared to each empty plasmid strain (BE31 and AMJ2008, respectively), but there was no statistical difference.

Key words: Colon cancer prevention, *Lactococcus lactis*, lactoferrin