

Investigating the effect of extracellular vesicles isolated from clinical strains of *Helicobacter pylori* on induction of epithelial-mesenchymal transition in insulin-resistant HepG2 cell line

Ghazaleh Talebi¹, Parvaneh Saffarian¹, Mojdeh Hakemi-Vala², Amir Sadeghi³, Abbas Yadegar^{4*}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Medical school, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: *Helicobacter pylori* is a Gram-negative and microaerophilic pathogen that can release extracellular vesicles (EVs) containing proteins and different virulence factors. In addition to gastroduodenal diseases, this bacterium also plays a role in extra-gastroduodenal diseases such as insulin resistance (IR). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is considered a key process in the development of cancer, and several factors contribute to the initiation of this process, but the exact role of insulin in the EMT process has not yet been elucidated. This study aimed to investigate the effect of *H. pylori*-derived EVs on the induction of EMT in the insulin-resistant HepG2 cell line.

Materials and Methods: Two clinical isolates of *H. pylori* were obtained from patients with gastritis and peptic ulcer. Ultracentrifugation was used to extract *H. pylori*-derived EVs. In order to investigate the effect of EVs on the induction of EMT in IR, the HepG2 cell line was used to establish the IR model. An RT-qPCR assay was performed to evaluate the expression level of key genes involved in the EMT process, such as E-cadherin, snail, vimentin.

Results: The results of RT-qPCR showed that *H. pylori*-derived EVs can increase the expression of snail and vimentin and decrease the expression of *E-cadherin* genes under IR conditions.

Conclusion: The results obtained from the present study showed that *H. pylori*-derived EVs are capable of inducing the EMT process in the HepG2 cell line in addition to inducing hepatic IR.

Keywords: *Helicobacter pylori*, insulin resistance, epithelial-mesenchymal transition, HepG2 cells, E-cadherin

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری^۱ یک پاتوژن گرم منفی، ماریچ، میکروآئروفیل و دارای تاژک تک قطبی می باشد (۱). راه‌های دهانی-دهانی و مدفوعی-دهانی به عنوان محتمل‌ترین راه‌های انتقال این باکتری در نظر گرفته می شوند (۲). از نظر آماری حدود نیمی از جمعیت جهان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مبتلا هستند که اکثراً بدون علامت باقی می ماندند (۳). این باکتری توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) به عنوان کارسینوژن کلاس I طبقه بندی شده است، به همین دلیل درمان این عفونت از اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی به شمار می رود (۴). هلیکوباکتر پیلوری می تواند علاوه بر بیماری‌های معده همچون گاستریت، زخم معده و سرطان در ایجاد بیماری‌های خارج از معده همچون آترواسکلروزیس، کبد چرب غیر الکلی، دیابت تیپ ۲، مقاومت به انسولین (IR)^۲، بیماری‌های تنفسی و آلزایمر نقش داشته باشد (۵-۷).

هلیکوباکتر پیلوری همانند سایر باکتری‌ها قادر است وزیکول‌های خارج سلولی (EVs)^۳ با اندازه‌های حدود ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر آزاد کند که حاوی اسیدهای نوکلئیک، فاکتورهای بیماری‌زایی مختلف از جمله انکوپروتئین CagA، VacA، پروتئین‌ها و لیپیدهای مختلف دیگری می باشند (۶ و ۸). این وزیکول‌ها ضمن اینکه در خون افراد آلوده به این عفونت یافت می شوند، در ارتباطات سلولی نقش داشته و می توانند توسط هلیکوباکتر پیلوری برای انتقال فاکتورهای بیماری‌زایی به سلول میزبان به کار گرفته شوند (۹ و ۱۰). این پاتوژن می تواند از طریق ورید باب خود را به کبد برساند و موجب آسیب کبدی شود و از طریق مسیر سیگنالینگ c-Jun/miR-203/socs3 منجر به القای مقاومت انسولینی گردد (۱۱ و ۱۲).

مقاومت به انسولین ارتباط تنگاتنگی با التهاب درجه پایین دارد و با توجه به جذب گلوکز در ماهیچه‌های اسکلتی، بافت چربی و نیز تولید گلوکز کبدی با ایجاد اختلال در عملکرد انسولین مشخص می شود (۱۳). هایپرانسولینمی که با مقاومت به

انسولین مرتبط می باشد، شرایطی است که می تواند در تسریع فرایند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT)^۴ که یک فرایند کلیدی در پیشرفت سرطان است مؤثر باشد اما با این حال نقش انسولین به طور دقیق در بروز EMT مشخص نشده است (۱۴ و ۱۵). این فرایند نه تنها به بازسازی بافت و بهبود زخم کمک می کند، بلکه در پیشرفت سرطان و فیبروز اندام نیز نقش دارد (۱۶). مطالعه‌های اخیر نشان می دهند هلیکوباکتر پیلوری از طریق CagA با افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی و کاهش بیان برخی از مارکرهای اپیتلیال باعث القای EMT می شود (۱۷-۱۹). عفونت هلیکوباکتر پیلوری با القای چندین پاسخ التهابی از طریق ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های کُشنده طبیعی باعث آزاد شدن واسطه‌های التهابی مانند سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و متالوپروتئینازها توسط سلول‌های معده می شود و فرایند EMT را توسط سلول‌های معده ترویج می کند (۲۰). در طول EMT سلول‌های اپیتلیال از سلول‌های مجاور جدا می شوند و به بافت اطراف نفوذ می کنند و پس از اینکه دستخوش تغییرهای مورفولوژیکی چشمگیری شدند، عملکرد مزانشیمی پیدا می کنند و به دنبال آن تهاجم یا متاستاز سرطان ایجاد می شود (۲۱ و ۲۲). فرایند EMT سلول‌های سرطانی از جمله HepG2 با از بین رفتن چسبندگی سلولی و از دست دادن مارکرهای اپیتلیال مانند E-cadherin و نیز افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی مانند Vimentin و نیز فاکتورهای رونویسی القاکننده EMT مانند Snail، Slug و Twist آغاز می شود (۲۱ و ۲۳). شواهد بالینی نشان داده است که عفونت هلیکوباکتر پیلوری بیان برخی از فاکتورهای رونویسی را که در تنظیم EMT دخیل هستند افزایش می دهد که از بین آن‌ها می توان به TGF- β و SMAD اشاره کرد (۲۱). EMT با تغییر متابولیسم گلوکز و یا فعال کردن آنزیم‌های گلیکولیتیک می تواند در بیماری‌های متابولیک نقش داشته باشد. از جمله ژن‌های متابولیکی که توسط EMT تنظیم می شوند می توان به ژن‌های ناقل گلوکز ۳ (GLUT3) و گلوتامیناز ۱ (GLS1) اشاره کرد (۲۴). طبق بررسی

¹ *Helicobacter Pylori*

² Insulin Resistance

³ Extracellular Vesicles

⁴ Epithelial-Mesenchymal Transition

(New Brunswick Scientific, Innova® CO-170) USA انکوبه شدند. شناسایی و تعیین هویت ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری با بررسی میکروسکوپی و انجام تست‌های بیوشیمیایی شامل واکنش مثبت در تست‌های اکسیداز، کاتالاز و اوره‌آز و همچنین روش PCR انجام شد (۲۹).

۲-۲- استخراج DNA ژنومی

جهت تخلیص DNA ژنومی از کلنی‌های هلیکوباکتر پیلوری از کیت QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های DNA استخراج‌شده در دمای ۲۰°C نگهداری شد (۲۹).

۲-۳- بررسی فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری

با استفاده از روش PCR فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری از جمله ژن‌های *cagA*، واریانت‌های آللی *vacA* (s و m)، *babA2*، *sabA* و ژن‌های *iceA1* و *iceA2* بررسی شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Polymerase Master Mix (RED, Ampliqon, Odense, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱۲ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. ترموسایکلر (Eppendorf, Hamburg, Germany) برای انجام واکنش استفاده شد. جدول ۱ توالی‌های الیگونوکلوئیدی مورد استفاده برای ژنوتیپ بیماری‌زایی این باکتری را نشان می‌دهد.

مطالعه‌های مختلف، مقاومت به انسولین و التهاب کبدی می‌تواند در وقوع EMT نقش داشته باشد (۲۵ و ۲۶).

با توجه به اینکه مطالعه‌های گذشته نقش هلیکوباکتر پیلوری را در بروز اختلال‌های متابولیک همچون مقاومت به انسولین و همچنین القای فرایند EMT نشان داده‌اند، از این‌رو در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری در القای EMT در رده سلولی HepG2 مقاوم به انسولین بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری

در این مطالعه دو سویه بالینی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت (BY-1: *cagA*⁺, *vacA s1m1*, *sabA*⁻, *babA2*⁺) و زخم معده (OC824: *cagA*⁺, *vacA s1m2*, *sabA*⁻, *babA2*⁺) از آزمایشگاه تحقیقاتی هلیکوباکتر پیلوری در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران تهیه شد (۲۷ و ۲۸). به‌طور خلاصه، سویه‌ها بر روی پلیت‌های بروسلا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS)، ۷ درصد خون دیفبرینه گوسفند، مکمل انتخابی کمپیلوباکتر (پلی میکسین ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر، ونکومایسین ۲ میلی گرم در لیتر و تری متوپریم ۱ میلی گرم در لیتر) (Skirrow, UK, Quelab) و آمفوتریسین B (۲/۵ میلی گرم در لیتر) کشت و تحت شرایط میکروآئرو فیل (۵٪ O₂، ۱۰٪ CO₂ و ۸۵٪ N₂) به مدت ۳-۵ روز در انکوباتور CO₂

جدول ۱- توالی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای PCR

منبع	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (°C)	توالی (۵'←۳')	ژن هدف
(۳۰)	۴۰۰	۵۷	F: AATACACCAACGCCTCCAAG R: TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC	<i>cagA</i>
(۳۱)	۵۷۰/۶۴۵	۵۷	F: CAATCTGTCCAATCAAGCGAG R: GCGTCAAAATAATTCCAAGG	<i>vacA m1/m2</i>
(۳۱)	۲۵۹/۲۸۶	۵۷	F: ATGGAAATACAACAACACAC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	<i>vacA s1/s2</i>
(۳۱)	۶۹۶	۵۸	F: TATTTCTGGAACCTTGCGCAACCTGAT R: GGCCTACAACCGCATGGATAT	<i>iceA1</i>
(۳۱)	۶۰۸	۵۸	F: CGGCTGTAGGCACTAAAGCTA R: TCAATCCTATGTGAAACAATGATCGTT	<i>iceA2</i>

<i>babA2</i>	F: CCAAACGAAACAAAAAGCGT R: GCTTGTGTAAGGCCGTCGT	۵۲	۲۷۱	(۳۲)
<i>sabA</i>	F: TTTTGTGCTACGCTACGCGTTC R: ACCGAAGTGATAACGGCTTG	۵۵	۵۸۱	(۳۳)

توری مانند در دمای اتاق خشک و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) تصاویر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری ثبت گردید (۳۶).

۲-۶- کشت رده سلولی HepG2

رده سلولی سرطان کبد HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های HepG2 در محیط DMEM با ۱۰٪ FBS، اسیدآمینه غیرضروری (GibcoTM/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱٪ در دمای ۳۷°C در انکوباتور اتمسفر مرطوب حاوی ۵٪ CO₂ کشت داده شدند.

۲-۷- سنجش زنده‌مانی سلولی

جهت بررسی اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری بر زنده‌مانی سلول‌های HepG2، با استفاده از کیت (Sigma-Aldrich, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، تست MTT انجام شد. سلول‌های HepG2 با تراکم ۱×۱۰^۵ سلول در چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت و همراه با وزیکول‌های خارج‌سلولی در ۵ غلظت سریالی (۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در شرایط بیان‌شده در بالا، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. رنگ MTT به چاهک‌ها اضافه و در دمای ۳۷°C به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. بلورهای فورمازان با افزودن دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر به ازای هر چاهک حل شدند و چگالی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا-ریدر اندازه‌گیری شد (۳۷).

۲-۸- القای مدل مقاومت انسولینی

با توجه به دستورالعمل بیان‌شده در مطالعه‌های قبلی، مدل مقاومت انسولینی کبدی با استفاده از سلول‌های HepG2 ایجاد شد (۳۸). به‌طور خلاصه، سلول‌های HepG2 در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط DMEM (BioSera Co., Cholet, France) با گلوکز پایین، بدون FBS با غلظت‌های ۱۰×۱۰^{-۵}، ۱۰×۱۰^{-۶}، ۱۰×۱۰^{-۷}، ۱۰×۱۰^{-۸}، ۱۰×۱۰^{-۹} مول بر لیتر محلول نوترکیب انسولین انسانی (Capricorn Co., Germany) تحت شرایط بیان‌شده به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

۲-۴- تخلیص وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری

وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از اولتراسانتریفیوژ، طبق دستورالعمل مطالعه Sadeghloo و همکاران استخراج شد (۳۴). به‌طور خلاصه باکتری‌ها به محیط BHI برات (Merck, Darmstadt, Germany) حاوی ۱۰٪ FCS تلقیح شدند و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بیان‌شده در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند تا OD₆₀₀ به ۱ رسید. سوپانسیون کشت باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه برای سه بار در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد تا بقایای هلیکوباکتر پیلوری حذف گردد. مایع رویی با استفاده از فیلترهای خلاء ۰/۴۵ میکرومتر و ۰/۲۲ میکرومتر (Nantong FilterBio® Membrane Co., Ltd, China) برای از بین بردن سلول‌های باقی‌مانده فیلتر شد. محلول فیلترشده تحت اولتراسانتریفیوژ (Model L5-50 Ultracentrifuge, Beckman, USA) در دمای ۴°C ۲۰۰۰۰×g به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ ۳۰۰ میکرولیتر محلول phosphate-buffered saline (PBS) استریل (pH7) برای رقیق شدن رسوب سلولی مورد استفاده قرار گرفت. وزیکول‌های خارج‌سلولی تخلیص‌شده جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰°C نگهداری شدند. غلظت پروتئین وزیکول‌های استخراج‌شده از هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از کیت سنجش پروتئین (Parstous, Mashhad, Iran) bicinchoninic acid (BCA) تعیین شد. محتوای پروتئینی وزیکول‌های خارج‌سلولی این باکتری با استفاده از سدیم‌دودسیل‌سولفات-پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز ۱۲ درصد (SDS-PAGE) جدا شده و با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو قابل مشاهده گردیدند (۳۵).

۲-۵- میکروسکوپ الکترونی گذاره

برای ارزیابی مورفولوژی و اندازه وزیکول‌های خارج‌سلولی، ۱۰ میکرولیتر از محلول PBS حاوی این نانوذرات بر روی یک شبکه مسی پوشش داده‌شده با کربن اضافه شد. پس از ۲ دقیقه انکوباسیون و حذف مایع، شبکه مسی بر روی اورانیل استات ۲٪ قرار داده شد. شبکه

سپس میزان گلوکز باقی‌مانده در محیط با استفاده از کیت
سنجش گلوکز (DeltaDarman Part Co., Tehran, Iran) طبق
دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

۱۰-۲- جداسازی RNA، سنتز cDNA و RT-qPCR

استخراج RNA کل از سلول‌های HepG2 با استفاده از کیت (Parstous Co., Mashhad, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. خلوص RNA توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت (Parstous Co., Mashhad, Iran) براساس راهنمای شرکت سازنده انجام شد. واکنش RT-qPCR به‌وسیلهٔ دستگاه Rotor-Gene® Q در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس SYBR green (Ampliqon, Odense, Denmark) بدون ROX، ۲ میکرولیتر cDNA، ۷ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر بود (جدول ۲). سطح بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد. ژن β -actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

۹-۲- تیمار سلول های HepG2 به وسیلهٔ وزیکول های

خارج سلولی ہلیکوباکٹر پیلوری

برای بررسی تأثیر وزیکول‌های مشق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری بر القای مقاومت انسولینی، سلول‌های HepG2 در میکروپلیت ۹۶ خاندهای تحت‌شرایط بیان‌شده کشت داده شدند. وزیکول‌ها در غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به هر چاهک حاوی DMEM با گلوکز پایین بدون FBS اضافه شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در اتمسفر مرطوب ۵٪ CO₂، مقدار باقی‌ماندهٔ گلوکز سلولی طبق راهنمای کیت سنجش گلوکز اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی اثر وزیکول‌ها بر روی مقاومت انسولینی، تفاوت در مصرف گلوکز بین سلول‌های HepG2 در

جدول ۲- توالی الیگونیوکلوئیدی پرایمرهای RT-qPCR

منبع	اندازهٔ محصول (bp)	توالی (۵'←۳')	ژن هدف
(۳۹)	۲۶۱	F: GGGTAGGGTAAATCAGTAAGAGGT R: GCATCGTATCACAGCAGGTT	β-actin
(۳۹)	۲۸۰	F: TGCTCTTGCTGTTTCTTCGG R: CTTCTCCGCCTCCTTCTTC	E-cadherin
(۳۹)	۳۱۰	F: CACTATGCCGCGCTCTTTC R: TCCTGGAAGGTAAACTCTGGAT	snail
(۳۹)	۴۲۶	F: CCAGGCCAAAGCAGGAGTC R: CGAAGGTGACGAGCCATT	vimentin

پروفايل پروتئينى وزيكول هاى استخراج شده با استفاده از SDS-PAGE ۱۲٪ موردبررسى قرار گرفت. به دنبال رنگ آميزى كوماسى بلو، پروفايل پروتئينى وزيكول هاى مشتق شده از هليكوباكتر پيلورى محدوده ۱۰-۱۷۰ كيلوالتون را نشان دادند (شكل ۱-۱A). تصاوير ميكروسكوپ TEM، شكل كروى وزيكول ها را با نانوساختارهاى غشاىي دولايه نشان داد (شكل ۱-۱B و C).

۲-۳- سنجش بقای سلولی

تیمار سلول های HepG2 با غلظت های مختلف وزیکول های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری سویه های OC824 (شکل ۲-A) و *BY-1* (شکل ۲-B) (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) تأثیر معنی داری بر زنده ماندن سلول نداشت. اما در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰

۱۱-۲- تحلیل آماری

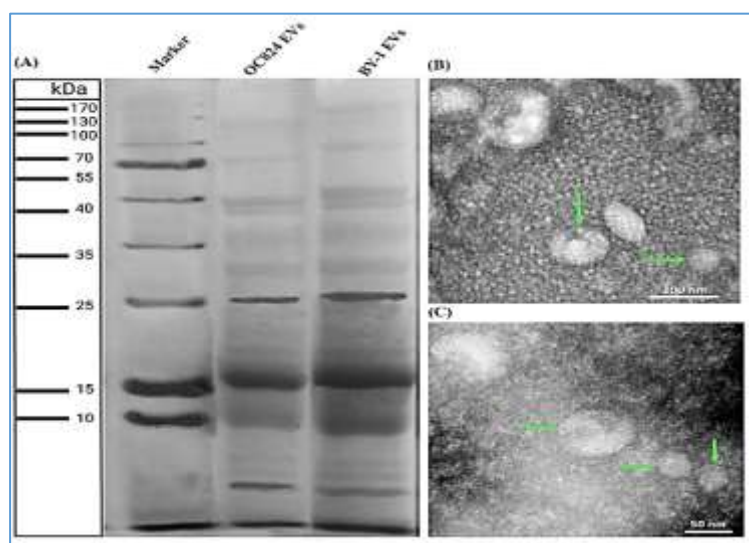
تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ (Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد. برای تعیین معناداری آماری بین گروه ها، داده ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Dunnett مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ SEM (خطای استاندارد میانگین) با سه آزمایش مستقل گزارش شد. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و همچنین $p < 0.05$ و $p < 0.01$ ^{###} برای نشان دادن معنادار بودن در نظر گرفته شدند.

۳- نتایج

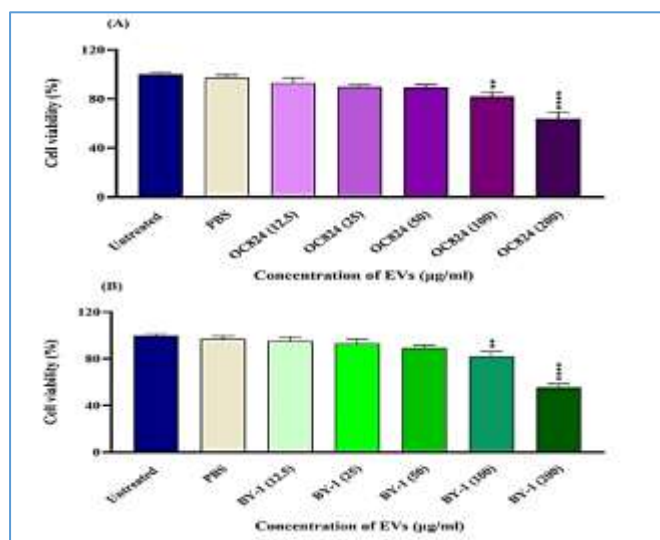
۱-۳- ساختار و محتوای پروتئینی وزیکول‌های

خارج سلولی مشتق شده از هلیکوباکتر پیلوری

میکروگرم بر میلی لیتر به طور قابل توجهی باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های HepG2 شد ($p < 0.0001$ و $p < 0.01$).



شکل ۱- ویژگی وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از هلیکوباکتر پیلوری. (A). آنالیز محتوای پروتئینی وزیکول‌ها با استفاده از ۱۲٪ SDS-PAGE و سپس مشاهده با رنگ آمیزی کوماسی بلو انجام شد. جرم مولکولی (برحسب کیلودالتون) توسط خطوط سمت چپ نشان داده شده است. وزن مولکولی وزیکول‌های استخراج شده در محدوده ۱۰-۱۷۰ کیلودالتون بود. (B). تصاویر TEM از وزیکول‌های جدا شده، شکل کروی آن‌ها را نشان می‌دهد که عاری از هر گونه آلودگی مانند اجزای باکتریایی و اجسام پروتئینی هستند.



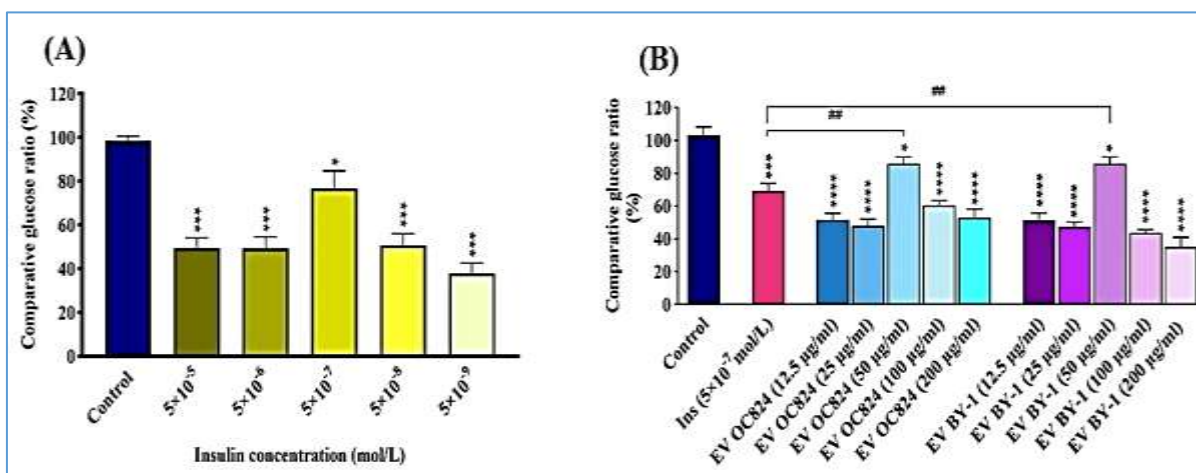
شکل ۲- ارزیابی اثرهای وزیکول‌های مشتق شده از هلیکوباکتر پیلوری سویه‌های OC824 (نمودار A) و BY-1 (نمودار B) بر زنده‌مانی سلول‌های HepG2 با استفاده از روش MTT. مقادیر مختلفی از وزیکول‌ها (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت به سلول‌های HepG2 اضافه شد. وزیکول‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به طور قابل توجهی بر کاهش زنده‌مانی سلولی اثر داشتند ($p < 0.0001$ و $p < 0.01$). تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnett انجام شد. داده‌ها به عنوان میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است.

۳-۳- القای مدل مقاومت انسولینی در سلول‌های HepG2

برای ایجاد مدل مقاومت انسولینی، سلول‌های HepG2 به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های سریالی انسولین (5×10^{-9} تا 5×10^{-6} مول بر لیتر) قرار گرفتند. در غلظت 5×10^{-6} مول بر لیتر انسولین، مقدار گلوکز بیشتری در محیط باقی‌مانده بود، به عبارت دیگر سلول HepG2 کمترین میزان جذب گلوکز را در طول موج ۵۰۵ نانومتر نشان داد که به‌عنوان نقطه مقاومت انسولینی در نظر گرفته شد (شکل ۳-۳A).

۳-۴- تیمار سلول‌های HepG2 به‌وسیلهٔ وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری

بررسی جذب نوری گلوکز در ۵۰۵ نانومتر نشان داد که سلول‌های HepG2 تیمار شده با وزیکول‌های مشتق از هلیکوباکتر پیلوری در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین مصرف گلوکز را در مقایسه با مدل مقاومت انسولینی در غلظت 5×10^{-6} مول بر لیتر انسولین نشان دادند. بنابراین وزیکول‌های خارج‌سلولی باکتری قادر به القای مقاومت به انسولین هستند (شکل ۳-۳B).



شکل ۳-۳ (A) اثر غلظت‌های مختلف انسولین (5×10^{-9} تا 5×10^{-6} مول بر لیتر) بر سلول‌های HepG2. در غلظت 5×10^{-6} مول بر لیتر انسولین، میزان گلوکز باقی‌مانده در محیط بالاتر است که نشان‌دهندهٔ نقطه مقاومت به انسولین می‌باشد. (B) اثر غلظت‌های مختلف وزیکول‌های هلیکوباکتر پیلوری سوپره‌های OC824 و BY-1 (۱۲/۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر القای مقاومت انسولینی در سلول‌های HepG2. وزیکول‌های خارج‌سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث القای مقاومت به انسولین شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnet انجام شد. داده‌ها به‌عنوان میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$. همچنین $p < 0.01$ برای نشان دادن معنادار بودن در نظر گرفته شد.

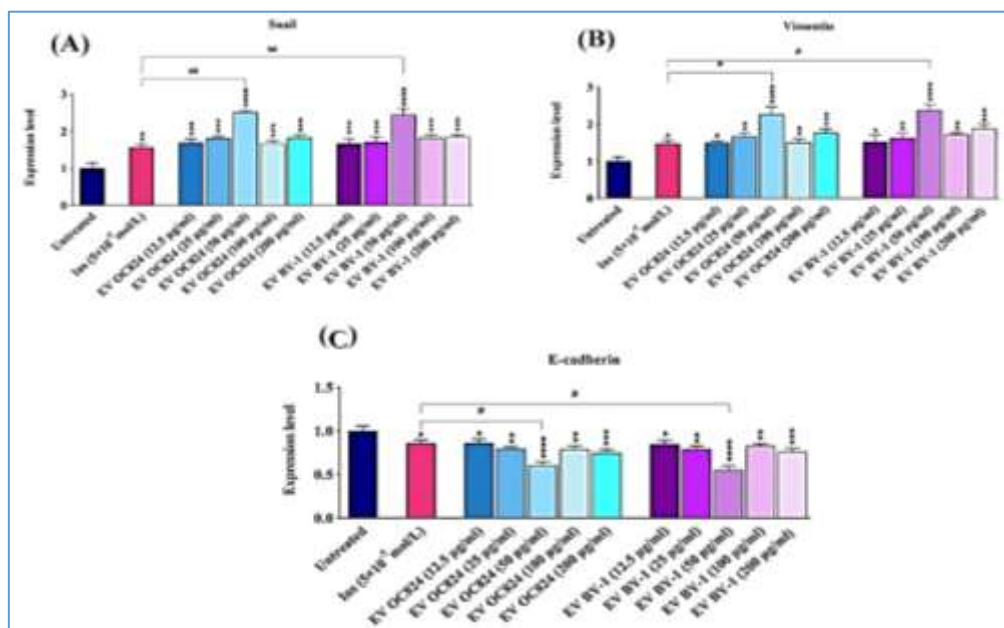
۳-۵- سطح بیان ژن‌های vimentin و E-cadherin در سلول‌های HepG2 تحت تأثیر انسولین و وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری

جهت بررسی اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری، سطح بیان ژن‌های دخیل در فرایند EMT در سلول‌های HepG2 تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است بیان ژن‌های snail و vimentin در سلول‌های HepG2 در نقطه مقاومت انسولینی (5×10^{-6} مول بر لیتر) نسبت به نمونه تیمار نشده افزایش معناداری داشتند ($p < 0.01$ و $p < 0.05$). در سلول‌های تیمار شده با وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری در غلظت ۵۰

میکروگرم در میلی‌لیتر (نقطه مقاومت انسولینی) نسبت به نمونه تیمار نشده افزایش بیان ژن‌ها به‌طور چشمگیری معنادار بود ($p < 0.0001$). همچنین بیان ژن‌های snail و vimentin در سلول‌های تیمار شده با وزیکول‌های خارج‌سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به سلول‌های تیمار شده با انسولین افزایش معناداری داشتند. سایر غلظت‌های وزیکول‌های خارج‌سلولی اختلاف معناداری با نمونه تیمار شده با انسولین نداشتند. بیان ژن E-cadherin در نقطه مقاومت انسولینی (5×10^{-6} مول بر لیتر) نسبت به نمونه تیمار نشده کاهش معناداری داشت ($p < 0.05$). علاوه بر این در سلول‌های تیمار شده با وزیکول‌های

وزیکول‌های خارج سلولی اختلاف معناداری با نمونه تیمار شده با انسولین نداشتند.

خارج سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با انسولین کاهش معناداری داشت ($p < 0.05$). سایر غلظت‌های



شکل ۴- اثر وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری پس از ۲۴ ساعت بر سطح بیان ژن‌های (A) snail، (B) vimentin و E-cadherin (C) در فرایند EMT در سلول‌های HepG2 به وسیله آزمون RT-qPCR از ژن β -actin به عنوان ژن مرجع استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnett انجام شد. داده‌ها به عنوان میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ و همچنین $p < 0.05$ و $p < 0.01$ برای نشان دادن معنادار بودن در نظر گرفته شد.

۴- بحث

بیماری‌های معده در ایجاد بیماری‌های خارج از معده از جمله سندرم متابولیک و مقاومت به انسولین نیز نقش دارد؛ بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۴۲). در فرایند EMT به دنبال تغییرهایی که در سلول‌های اپیتلیال رخ می‌دهد سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۴). Li و همکاران نشان دادند که پروتئین CagA هلیکوباکتر پیلوری قادر به تحریک EMT و در نهایت تومورزایی در معده می‌شود (۴۳). با توجه به اینکه وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری حاوی انکو پروتئین CagA هستند و می‌توانند احتمالاً در فرایند EMT در سلول‌های اپیتلیال معده، تومورزایی و در نهایت سرطان معده نقش داشته باشند، ارتباط بین این وزیکول‌ها و EMT در سلول‌های HepG2 مقاوم به انسولین تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. در این مطالعه بعد از بررسی وزیکول‌های خارج سلولی هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از SDS-PAGE و رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص شد که پروتئین

عفونت هلیکوباکتر پیلوری به دلیل تأثیر قابل توجهی که بر سلول‌های اپیتلیال معده دارد می‌تواند نقش بالقوه‌ای در فرایند EMT داشته باشد (۲۰). EMT به عنوان یک فرایند مرتبط با تغییرهای فنوتیپی سلول‌های اپیتلیال در شرایط پاتولوژیک مختلف از جمله مقاومت به انسولین نقش دارد (۴۰). در طول سال‌های گذشته برای مشخص شدن ارتباط بیماری‌های مرتبط با مقاومت به انسولین و سرطان تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته و نقش محوری مقاومت انسولینی در سرطان تأیید شده است. با وجود این، ارتباط مقاومت به انسولین با انواع مختلف سرطان به طور کامل تاکنون نشان داده نشده است (۴۱). در سال‌های اخیر، شواهد متعددی نقش بالقوه وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از هلیکوباکتر پیلوری را در تعدیل فرایندهای سلولی برجسته کرده است (۹). امروزه هلیکوباکتر پیلوری به دلیل اینکه علاوه بر

دیگری، Bolori و همکارانش نشان دادند که وزیکول‌های خارج‌سلولی استخراج‌شده از هلیکوباکتر پیلوری قادر به افزایش بیان ژن‌های snail، vimentin و کاهش بیان ژن E-cadherin در رده سلولی LX-2 بودند. همچنین این نتایج همسو با مطالعه حاضر بود. شباهت این یافته‌ها در این دو رده سلولی کبدی مختلف می‌تواند به دلیل فعال شدن مسیر TGF- β /SMAD باشد که در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در فرایند EMT در رده‌های سلولی HepG2 و LX-2 نقش دارند (۴۸ و ۴۹).

۵- نتیجه‌گیری

وزیکول‌های مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری دارای قابلیت القای مقاومت انسولینی در رده سلولی HepG2 هستند و می‌توانند با افزایش بیان ژن‌های snail، vimentin و کاهش بیان ژن E-cadherin در فرایند EMT در این رده سلولی دخیل باشند. به بیان دیگر این وزیکول‌ها می‌توانند در القای فرایند EMT در سلول‌های HepG2 مقاوم به انسولین نقش داشته باشند.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه کارکنان آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، واقع در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صمیمانه تشکر می‌کنند.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی وجود ندارد.

۹- سهم نویسندگان

غزاله طالبی: اجرای بخش عملی پژوهش، تحلیل و تفسیر داده‌ها و نگارش مقاله. پروانه صفاریان: نگارش و ویرایش مقاله. مژده حاکمی والا: نگارش و ویرایش مقاله. امیر صادقی: مشاوره بالینی. عباس یادگار: طراحی مطالعه، تحلیل و تفسیر داده‌ها و نگارش و ویرایش نهایی مقاله.

وزیکول‌ها در دامنه ۱۰-۱۷۰ کیلودالتون می‌باشد که مشابه با نتیجه مطالعه Ahmed و همکاران بود. آن‌ها نشان دادند که وزیکول‌های مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری در بازه ۱۵۰-۲۵ کیلودالتون بود که در بازه پروتئینی به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر قرار داشت (۳۵). در این مطالعه پس از بررسی غلظت گلوکز در سلول‌های HepG2 تیمار شده با وزیکول‌های مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری و مقایسه آن با سلول‌های HepG2 در مدل مقاومت انسولینی مشخص شد که این وزیکول‌ها قادر به القای مقاومت انسولینی در رده سلولی HepG2 هستند. این نتایج همسو با مطالعه Zhou و همکاران بود که با بررسی غلظت گلوکز نشان دادند که سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های HepG2 دارای قابلیت القای مقاومت انسولینی هستند (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری توسط Chen و همکاران پس از انجام تست شاخص ارزیابی مدل هومئوستاتیک (HOMA-IR) در بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری دریافتند که این باکتری قادر است در ایجاد مقاومت انسولینی نقش داشته باشد (۵). بنابراین، طبق نتایج مطالعه حاضر شاید بتوان نتیجه گرفت وزیکول‌های مشتق‌شده از هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان جزیی از باکتری می‌توانند همانند هلیکوباکتر پیلوری در القای مقاومت انسولینی مؤثر باشند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که وزیکول‌های خارج‌سلولی هلیکوباکتر پیلوری می‌توانند با افزایش بیان ژن‌های snail، vimentin و همچنین کاهش بیان ژن E-cadherin در فرایند EMT در رده سلولی HepG2 نقش داشته باشند. این نتایج مشابه با یافته‌های Chang و همکارانش بود که نشان دادند سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با افزایش بیان ژن‌های snail، vimentin و کاهش بیان E-cadherin در رده سلولی AGS قادر به القای EMT بودند (۴۴). در یک مطالعه دیگر Sougleri و همکارانش نشان دادند که سویه‌های cagA مثبت هلیکوباکتر پیلوری قادر به القای EMT در رده سلولی AGS هستند. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر نیز وزیکول‌های استخراج‌شده از سویه‌های cagA مثبت بودند به‌نظر می‌رسد سویه‌های cagA مثبت نقش کلیدی‌تری در القای فرایند EMT دارند. همچنین نتایج مطالعه این محققان نشان داد که بیان ژن‌های snail و vimentin به‌عنوان ژن‌های دخیل در EMT در رده سلولی AGS افزایش یافت که مشابه نتایج مطالعه حاضر در رده سلولی HepG2 بود (۴۵). این شباهت ممکن است به دلیل فعال شدن فرایند EMT توسط TGF- β در هر دو رده سلولی HepG2 و AGS باشد (۴۶ و ۴۷). در مطالعه

۱۰- منابع

1. Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, et al. *Helicobacter pylori* virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells*. 2020;10(1):27.
2. Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou J-M, Peek R, Schulz C, et al. *Helicobacter pylori* infection. *Nature reviews Disease primers*. 2023;9(1):19.
3. Shirani M, Pakzad R, Haddadi MH, Akrami S, Asadi A, Kazemian H, et al. The global prevalence of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23(1):543.
4. Stefano K, Marco M, Federica G, Laura B, Barbara B, Gioacchino L, et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. 2018;89(Suppl 8):72.
5. Chen L-W, Chien C-Y, Yang K-J, Kuo S-F, Chen C-H, Chien R-N. *Helicobacter pylori* infection increases insulin resistance and metabolic syndrome in residents younger than 50 years old: a community-based study. *PloS one*. 2015;10(5):e0128671.
6. Qiang L, Hu J, Tian M, Li Y, Ren C, Deng Y, et al. Extracellular vesicles from *helicobacter pylori*-infected cells and *helicobacter pylori* outer membrane vesicles in atherosclerosis. *Helicobacter*. 2022;27(2):e128.YY
7. Doulberis M, Papaefthymiou A, Kountouras J. Special Issue “Extragastric Disorders of *Helicobacter pylori* Infection: From Diagnosis to Treatment”. *MDPI*; 2023. p. 677.
8. Choi H-I, Choi J-P, Seo J, Kim BJ, Rho M, Han JK, et al. *Helicobacter pylori*-derived extracellular vesicles increased in the gastric juices of gastric adenocarcinoma patients and induced inflammation mainly via specific targeting of gastric epithelial cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(5):e330-e.
9. Li Y, Cao H, Qiu D, Wang N, Wang Y, Wen T, et al. The proteomics analysis of extracellular vesicles revealed the possible function of heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* infection. *Cancer Cell International*. 2023;23(1):272.
10. González MF, Díaz P, Sandoval-Bórquez A, Herrera D, Quest AF. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles and extracellular vesicles from *Helicobacter pylori*-infected cells in gastric disease development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4823.
11. Abo-Amer YE-E, Sabal A, Ahmed R, Hasan NFE, Refaie R, Mostafa SM, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a developing country: a cross-sectional study. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2020;619-25.
12. Taylor N, Fox J, Yan L. In-vitro hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori* and other *Helicobacter* species. *Journal of medical microbiology*. 1995;42(1):48-52.
13. Zhou X, Liu W, Gu M, Zhou H, Zhang G. *Helicobacter pylori* infection causes hepatic insulin resistance by the c-Jun/miR-203/SOCS3 signaling pathway. *Journal of gastroenterology*. 2015;50:1027-40.
14. Rodriguez-Monteros C, Díaz-Aragon R, Leal-Orta E, Cortes-Reynosa P, Perez Salazar E. Insulin induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(5):4061-71.
15. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes care*. 2008;31(Supplement_2):S262-S8.
16. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Rigaud M. Epithelial mesenchymal transition: a double-edged sword. *Clinical and translational medicine*. 2015;4:1-6.
17. Eddin TMJ, Nasr SM, Gupta I, Zayed H, Al Moustafa A-E. *Helicobacter pylori* and epithelial mesenchymal transition in human gastric cancers: An update of the literature. *Heliyon*. 2023.
18. Ouyang Y, Liu G, Xu W, Yang Z, Li N, Xie C, et al. *Helicobacter pylori* induces epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via the AKT/GSK3 β signaling pathway. *Oncology Letters*. 2021;21(2):1-.
19. Bessède E, Staedel C, Acuña Amador L, Nguyen P, Chambonnier L, Hatakeyama M, et al. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene*. 2014;33(32):4123-31.

20. Baj J, Korona-Główniak I, Forma A, Maani A, Sitarz E, Rahnama-Hezavah M, et al. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition and tumor microenvironment in *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Cells*. 2020;9(4):1055.
21. Choi YJ, Kim N, Chang H, Lee HS, Park SM, Park JH, et al. *Helicobacter pylori*-induced epithelial-mesenchymal transition, a potential role of gastric cancer initiation and an emergence of stem cells. *Carcinogenesis*. 2015;3۶:۵۵۳-۵۶۶.
22. Roche J. The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *MDPI*; 2018. p. 52.
23. Ren Y, Wang Y, Hao S, Yang Y, Xiong W, Qiu L, et al. NFE2L3 promotes malignant behavior and EMT of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells via Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Cancer*. 2020;11(23):6939.
24. Sciacovelli M, Frezza C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *The FEBS journal*. 2017;284(19):3132-44.
25. Svegliati-Baroni G, Faraci G, Fabris L, Saccomanno S, Cadamuro M, Pierantonelli I, et al. Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut*. 2011;60(1):108-15.
26. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*. 2009;50(6):2007-13.
27. Yadegar A, Mohabati Mobarez A, Zali MR. Genetic diversity and amino acid sequence polymorphism in *Helicobacter pylori* CagL hypervariable motif and its association with virulence markers and gastroduodenal diseases. *Cancer medicine*. 2019;8(4):1619-32.
28. Nabavi-Rad A, Jamshidizadeh S, Azizi M, Yadegar A, Robinson K, Monaghan TM, et al. The synergistic effect of *Levilactobacillus brevis* IBRC-M10790 and vitamin D3 on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13:1171469.
29. Azizimoghaddam Y, Kermanpour S, Mirzaei N, Houri H, Nabavi-Rad A, Asadzadeh Aghdai H, et al. Genetic diversity of *Helicobacter pylori* type IV secretion system *cagI* and *cagN* genes and their association with clinical diseases. *Scientific Reports*. 2023;13(1):10264.
30. Eng NF, Ybazeta G, Chapman K, Fraleigh NL, Letto R, Altman E, et al. Antimicrobial susceptibility of Canadian isolates of *Helicobacter pylori* in Northeastern Ontario. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2015;26:137-44.
31. Saha DR, Datta S, Chattopadhyay S, Patra R, De R, Rajendran K, et al. Indistinguishable cellular changes in gastric mucosa between *Helicobacter pylori* infected asymptomatic tribal and duodenal ulcer patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2009;15(9):1105.
32. Ozbey G, Aygun C. Prevalence of genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from patients in eastern Turkey and the association of these genotypes with clinical outcome. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43:1332-9.
33. Farzi N, Yadegar A, Sadeghi A, Asadzadeh Aghdai H, Marian Smith S, Raymond J, et al. High prevalence of antibiotic resistance in Iranian *Helicobacter pylori* isolates: importance of functional and mutational analysis of resistance genes and virulence genotyping. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(11):2004.
34. Sadeghloo Z, Saffarian P, Hakemi-Vala M, Sadeghi A, Yadegar A. The modulatory effect of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 on autophagy induced by extracellular vesicles of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*. 2024;188:106559.
35. Ahmed AAQ, Zheng R, Abdalla AM, Bakadia BM, Qi F, Xiao L, et al. Heterogeneous populations of outer membrane vesicles released from *Helicobacter pylori* SS1 with distinct biological properties. *Engineered Science*. 2021;15:148-65.
36. Chamgordani SZ, Yadegar A, Azimirad M, Ghourchian H. An ultrasensitive genosensor for detection of toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* based on a conserved sequence in surface layer protein coding gene. *Talanta*. 2024;275:126014.
37. Azimirad M, Noori M, Azimirad F, Gholami F, Naseri K, Yadegar A, et al. Curcumin and capsaicin regulate apoptosis and alleviate intestinal inflammation induced by *Clostridioides difficile* in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2022;21(1):41.

38. Huang Q, Chen L, Teng H, Song H, Wu X, Xu M. Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK: anti-diabetic effect of phenolic compounds in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*. 2015;19:487-94.
39. Bolori S, Shegefti S, Baghaei K, Yadegar A, Moon K-M, Foster LJ, et al. The effects of Helicobacter pylori-derived outer membrane vesicles on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in vitro. *BioMed Research International*. 2023;2023.
40. Zelenko Z, Gallagher EJ, Antoniou IM, Sachdev D, Nayak A, Yee D, et al. EMT reversal in human cancer cells after IR knockdown in hyperinsulinemic mice. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(9):747-58.
41. Chiefari E, Mirabelli M, La Vignera S, Tanyolaç S, Foti DP, Aversa A, et al. Insulin resistance and cancer: in search for a causal link. *International journal of molecular sciences*. 20۱۱۳۷:(۲۰)۲۲;۲۱
42. Park JY. Extragastric Manifestations of H. pylori Infection: Lower GI Disorders. *Helicobacter pylori*: Springer; 2024. p. 447-56.
43. Li N, Feng Y, Hu Y, He C, Xie C, Ouyang Y, et al. Helicobacter pylori CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37:1-15.
44. Chang H, Kim N, Park JH, Nam RH, Choi YJ, Park SM, et al. Helicobacter pylori might induce TGF- β 1-mediated EMT by means of cagE. *Helicobacter*. 2015;20(6):438-48.
45. Sougleri IS, Papadakos KS, Zadik MP, Mavri-Vavagianni M, Mentis AF, Sgouras DN. Helicobacter pylori CagA protein induces factors involved in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in infected gastric epithelial cells in an EPIYA-phosphorylation-dependent manner. *Wiley Online Library*; 2016. p. 206-20.
46. Lin XL, Liu M, Liu Y, Hu H, Pan Y, Zou W, et al. Transforming growth factor β 1 promotes migration and invasion in HepG2 cells: Epithelial-to-mesenchymal transition via JAK/STAT3 signaling. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018;41(1):129-36.
47. Kahn mouei SA, Baghaei K, Pakzad P, Hashemi M, Zali MR. The role of extracellular matrix proteins in gastric cancer development via epithelial-mesenchymal transition. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2020;13(Suppl1):S139.
48. Tee JK, Peng F, Tan YL, Yu B, Ho HK. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates fibrosis and disrupts TGF- β -mediated SMAD pathway in activated hepatic stellate cell line LX2. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1018.
49. Liu X-N, Wang S, Yang Q, Wang Y-J, Chen D-X, Zhu X-X. ESC reverses epithelial mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β via inhibition of Smad signal pathway in HepG2 liver cancer cells. *Cancer Cell International*. 2015;15:1-10.