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 Talebi[1], Parvaneh Saffarian[1], Mojdeh Hakemi-Vala[2], Amir Sadeghi[3], 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

***Corresponding Author:** Associate Professor, Director, Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran .
Emails: a.yadegar@sbmu.ac.ir

بررسی اثر وزیکول های خارج سلولی جدا شده از سویه های بالینی هلیکوباکتر پیلوری در القای انتقال مزانشیمی اپیتلیال در روی رده سلولی HepG2 مقاوم به انسولین

غزاله طالبی[۱]، پروانه صفاریان[۱]، مژده حاکمی والا[۲]، امیر صادقی[۳]، عباس یادگار[۴*]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گواش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *هلیکوباکتر پیلوری* (*Helicobacter pylori*) یک پاتوژن گرم منفی بوده که قادر است وزیکول های خارج سلولی آزاد کند که حاوی پروتئین ها و عوامل بیماری زایی متعددی هستند. این باکتری علاوه بر بیماری های معده در ایجاد بیماری های خارج از معده مانند مقاومت به انسولین نیز نقش دارد. انتقال اپیتلیال-مزانشیمی یک فرآیند کلیدی در گسترش سرطان به شمار می رود که عوامل متعددی در شروع این فرآیند نقش دارند، اما با این حال نقش دقیق انسولین در انتقال اپیتلیال-مزانشیمی مشخص نشده است. هدف این مطالعه بررسی اثر وزیکول های خارج سلولی مشتق شده از *هلیکوباکتر پیلوری* در القای انتقال اپیتلیال-مزانشیمی در رده سلولی HepG2 مقاوم به انسولین می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از دو سویه بالینی *هلیکوباکتر پیلوری* بدست آمده از بیماران مبتلا به گاستریت و زخم معده استفاده شد. وزیکول های استخراج شده از این باکتری توسط اولتراسانتریفیوژ استخراج گردید. جهت بررسی اثر وزیکول‌های خارج سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* در القای انتقال اپیتلیال-مزانشیمی در شرایط مقاومت به انسولین، مدل مقاومت انسولینی بر روی رده سلولی HepG2 ایجاد شد. آزمون RT-qPCR جهت بررسی میزان بیان ژن های کلیدی دخیل در فرآیند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی همچون E-cadherin, snail, vimentin انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از RT-qPCR نشان داد، وزیکول های مشتق شده از *هلیکوباکتر پیلوری* در شرایط مقاومت به انسولین قادر به افزایش بیان ژن های snail ، vimentin و کاهش بیان ژن E-cadherin هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد وزیکول های خارج سلولی حاصل از *هلیکوباکتر پیلوری* علاوه بر القای مقاومت انسولینی قادر به القای فرآیند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی در رده سلولی HepG2 هستند.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، مقاومت به انسولین، انتقال مزانشیمی اپیتلیال، سلول های HepG2، ژن E-cadherin.

نویسنده مسئول: رئیس مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
-پست الکترونیکی:
a.yadegar@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری[1] یک پاتوژن گرم‌منفی، مارپیچ، میکروآئروفیل و دارای تاژک تک‌قطبی می‌باشد (۱). راه‌های دهانی-دهانی و مدفوعی-دهانی به‌عنوان محتمل‌ترین راه‌های انتقال این باکتری درنظر گرفته می‌شوند (۲). از نظر آماری حدود نیمی از جمعیت جهان به عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* مبتلا هستند که اکثراً بدون‌علامت باقی می‌مانند (۳). این باکتری توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) به‌عنوان کارسینوژن کلاس I طبقه‌بندی شده است، به همین دلیل درمان این عفونت از اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی به‌شمار می‌رود (۴). *هلیکوباکتر پیلوری* می‌تواند علاوه‌بر بیماری‌های معده همچون گاستریت، زخم معده و سرطان در ایجاد بیماری‌های خارج از معده همچون آترواسکلروزیس، کبد چرب غیرالکلی، دیابت تیپ ۲، مقاومت به انسولین (IR[2])، بیماری‌های تنفسی و آلزایمر نقش داشته باشد (۵-۷).

هلیکوباکتر پیلوری همانند سایر باکتری‌ها قادر است وزیکول‌های خارج سلولی (EVs[3]) 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 می‌باشند (۶ و ۸). این وزیکول‌ها ضمن اینکه در خون افراد آلوده به این عفونت یافت می‌شوند، در ارتباطات سلولی نقش داشته و می‌توانند توسط *هلیکوباکتر پیلوری* برای انتقال فاکتورهای بیماری‌زایی به سلول میزبان به‌کار گرفته شوند (۹ و ۱۰). این پاتوژن می‌تواند 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 درجهٔ 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 می‌شود (۱۳). هایپرانسولینمی که با مقاومت به انسولین مرتبط می‌باشد، شرایطی است که می‌تواند در تسریع فرایند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT[4]) که یک فرایند کلیدی در پیشرفت سرطان است مؤثر باشد اما بااین‌حال نقش انسولین به‌طور دقیق در بروز EMT مشخص نشده است (۱۴ و ۱۵). این فرایند نه‌تنها به بازسازی بافت و بهبود زخم کمک می‌کند، بلکه در پیشرفت سرطان و فیبروز اندام نیز نقش دارد (۱۶). مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند *هلیکوباکتر پیلوری* از طریق CagA با افزایش بیان مارکرهای مزانشیمی و کاهش بیان برخی از مارکرهای اپیتلیال باعث القای EMT می‌شود (۱۷-۱۹). عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با القای چندین پاسخ التهابی از طریق ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های کُشندهٔ طبیعی باعث آزاد شدن واسطه‌های التهابی مانند سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و متالوپروتئینازها توسط سلول‌های معده می‌شود و فرایند EMT را توسط سلول‌های معده ترویج می‌کند (۲۰). در طول EMT سلول‌های اپیتلیال از سلول‌های مجاور جدا می‌شوند و به بافت اطراف نفوذ می‌کنند و پس از اینکه دستخوش تغییرهای مورفولوژیکی چشمگیری شدند، عملکرد مزانشیمی پیدا می‌کنند و به‌دنبال آن تهاجم یا متاستاز سرطان ایجاد می‌شود (۲۱ و ۲۲). فرایند EMT در 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 القاکنندهٔ EMT مانند Snail، Slug و Twist آغاز می‌شود (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 می‌دهد که از بین آن‌ها می‌توان به TGF-β و SMAD اشاره کرد (۲۱). EMT با تغییر متابولیسم گلوکز و یا فعال کردن آنزیم‌های گلیکولیتیک می‌تواند در بیماری‌های متابولیک نقش داشته باشد. از جمله ژن‌های متابولیکی که توسط EMT تنظیم می‌شوند می‌توان 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

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، ازاین‌رو در مطالعهٔ حاضر برای اولین‌بار اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* در القای EMT در ردهٔ سلولی HepG2 مقاوم به انسولین بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیهٔ سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*

در این مطالعه دو سویهٔ بالینی *هلیکوباکتر پیلوری* جداشده 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 پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران تهیه شد (۲۷ و ۲۸). به‌طور خلاصه، سویه‌ها بر روی پلیت‌های بروسِلا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FCS)، ۷ درصد خون دِفیبرینهٔ گوسفند، مکمل انتخابی کمپیلوباکتر (پلی‌میکسین ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، ونکومایسین ۲ میلی‌گرم در لیتر و تری‌متوپریم ۱ میلی‌گرم در لیتر) (Skirrow، Quelab، UK) و آمفوتریسین B (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت و تحت‌شرایط میکروآئروفیل (٪۵ O_2، ٪۱۰ CO_2 و ٪۸۵ N_2) به‌مدت ۳-۵ روز در انکوباتور CO_2 (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) موردارزیابی 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 *ice A2* 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 الیگونوکلئوتیدی مورداستفاده برای ژنوتیپ بیماری‌زایی این باکتری را نشان می‌دهد.

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای PCR

ژن هدف	توالی (´۵←´۳)	دمای اتصال (°C)	اندازهٔ محصول (bp)	منبع
*cag*A	F: AATACACCAACGCCTCCAAG R: TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC	۵۷	۴۰۰	(۳۰)
*vac*A m1/m2	F: CAATCTGTCCAATCAAGCGAG R: GCGTCAAAATAATTCCAAGG	۵۷	۵۷۰/۶۴۵	(۳۱)
*vac*A s1/s2	F: ATGGAAATACAACAAACACAC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۵۷	۲۵۹/۲۸۶	(۳۱)
*ice*A1	F: TATTTCTGGAACTTGCGCAACCTGAT R: GGCCTACAACCGCATGGATAT	۵۸	۶۹۶	(۳۱)
*ice*A2	F: CGGCTGTAGGCACTAAAGCTA R:TCAATCCTATGTGAAACAATGATCGTT	۵۸	۶۰۸	(۳۱)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

*bab*A2	F: CCAAACGAAACAAAAAGCGT R: GCTTGTGTAAAAGCCGTCGT	۵۲	۲۷۱	(۳۲)
*sab*A	F: TTTTTGTCAGCTACGCGTTC R: ACCGAAGTGATAACGGCTTG	۵۵	۵۸۱	(۳۳)

۲-۴- تخلیص وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری*

وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از اولتراسانتریفیوژ، طبق دستورالعمل مطالعهٔ Sadeghloo و همکاران استخراج شد (۳۴). به‌طور خلاصه باکتری‌ها به محیط BHI براث (Merck, Darmstadt, Germany) حاوی ۱۰٪ FCS تلقیح شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت در شرایط بیان‌شده در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند تا OD_{600} به ۱ رسید. سوسپانسیون کشت باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰×g به‌مدت 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 ۲۰۰۰۰۰×g به‌مدت ۳ ساعت قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ ۳۰۰ میکرولیتر. محلول phosphate-buffered saline (PBS) استریل (pH7) برای رقیق‌شدن رسوب سلولی مورداستفاده 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) جداشده و با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو قابل‌مشاهده گردیدند (۳۵).

۲-۵- میکروسکوپ الکترونی گذاره

برای ارزیابیِ مورفولوژی و اندازهٔ وزیکول‌های خارج‌سلولی، ۱۰ میکرولیتر از محلول PBS حاوی این نانوذرات بر روی یک شبکهٔ مسی پوشش داده‌شده با کربن اضافه شد. پس از ۲ دقیقه انکوباسیون و حذف مایع، شبکهٔ مسی بر روی اورانیل استات ۲٪ قرار داده شد. شبکهٔ توری‌مانند در دمای اتاق خشک و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Carl Zeiss, Oberkohen, Germany) تصاویر وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* ثبت گردید (۳۶).

۲-۶- کشت ردهٔ سلولی HepG2

ردهٔ سلولی سرطان کبد HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌های HepG2 در محیط DMEM با ۱۰٪ FBS، اسیدآمینهٔ غیرضروری (Gibco™/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱٪ در دمای ۳۷°C در انکوباتور اتمسفر مرطوب حاوی ۵٪ CO_2 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، به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. رنگ MTT به چاهک‌ها اضافه و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شد. بلورهای فورمازان با افزودن دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر به ازای هر چاهک حل شدند و چگالیِ نوری در طول‌موج 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 انسولینیِ کبدی با استفاده ازسلول‌های 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 $۵×۱۰^{-۵}$، $۵×۱۰^{-۶}$، $۵×۱۰^{-۷}$، $۵×۱۰^{-۸}$، $۵×۱۰^{-۹}$ مول بر لیتر محلول نوترکیب انسولین انسانی(Capricorn Co., Germany) تحت شرایط بیان‌شده به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

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

۹-۲- تیمار سلول‌های HepG2 به‌وسیلهٔ وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری*

برای بررسی تأثیر وزیکول‌های مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* بر القای مقاومت انسولینی، سلول‌های HepG2 در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای تحت‌شرایط بیان‌شده کشت داده شدند. وزیکول‌ها در غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰، 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٪ CO_2، مقدار باقی‌ماندهٔ گلوکز سلولی طبق راهنمای کیت سنجش گلوکز اندازه‌گیری شد. برای ارزیابیِ اثر وزیکول‌ها بر روی مقاومت انسولینی تفاوت در مصرف گلوکز بین سلول‌های HepG2 در مدل مقاومت انسولینی و تیمارشده با وزیکول‌های خارج‌سلولی بررسی 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 بیان‌نسبیِ ژن‌های موردمطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد. ژن *β-actin* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

جدول ۲- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای RT-qPCR

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

۱۱-۲- تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخهٔ ۸ (Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد. برای تعیین معناداری آماری بین گروه‌ها، داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون Dunnett مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین ± SEM (خطای استاندارد میانگین) با سه آزمایش مستقل گزارش شد. $^{*}p < ۰/۰۵$، $^{**}p < ۰/۰۱$، $^{***}p < ۰/۰۰۱$، $^{****}p < ۰/۰۰۰۱$ و همچنین $^{\#}p < ۰/۰۵$ و $^{\#\#}p < ۰/۰۱$ برای نشان دادن معنادار بودن درنظر گرفته شدند.

۳- نتایج

۱-۳- ساختار و محتوای پروتئینی وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری*

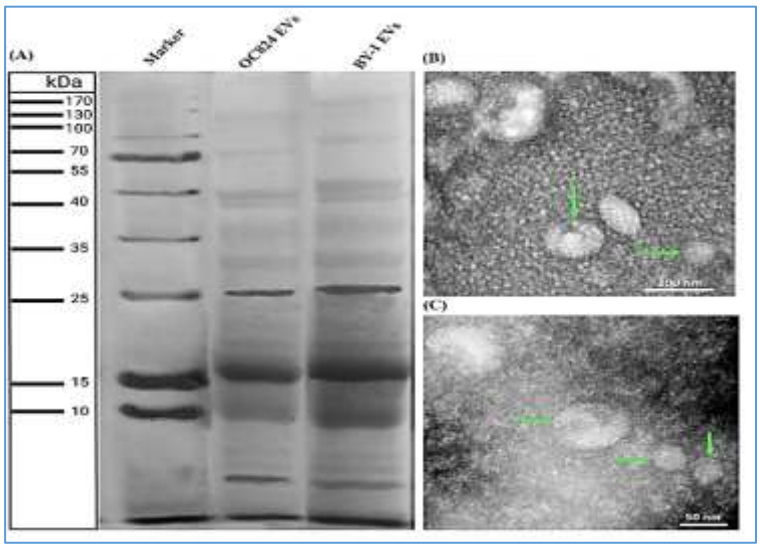
پروفایل پروتئینی وزیکول‌های استخراج‌شده با استفاده از SDS-PAGE ۱۲٪ موردبررسی قرار گرفت. به‌دنبال رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو، پروفایل پروتئینی وزیکول‌های مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* محدودهٔ ۱۰-۱۷۰ کیلودالتون را نشان دادند (شکل ۱-A). تصاویر میکروسکوپ TEM، شکل کروی وزیکول‌ها را با نانوساختارهای غشاییِ دولایه نشان داد (شکل ۱-B و C).

۲-۳- سنجش بقای سلولی

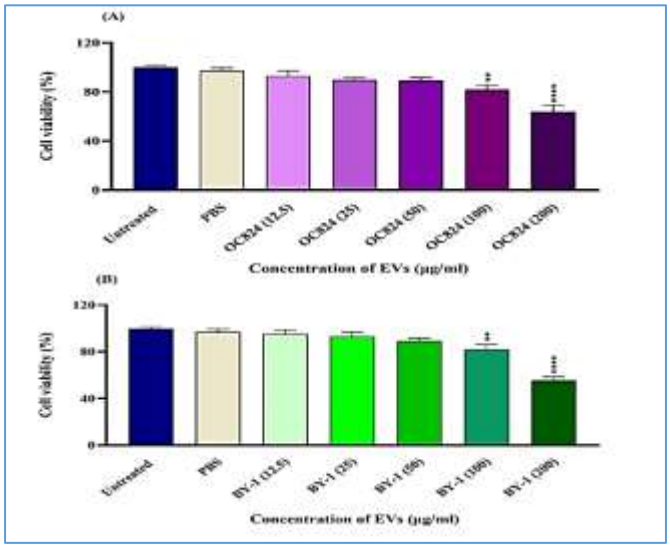
تیمار سلول‌های HepG2 با غلظت‌های مختلف وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* سویه‌های *OC824* (شکل ۲-A) و *BY-1* (شکل ۲-B) (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵میکروگرم در میلی‌لیتر) تأثیر معنی‌داری بر زنده‌ماندن سلول نداشت. اما در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های HepG2 شد ($p < ۰/۰۰۰۱$ **** و $p < ۰/۰۱$ **).



شکل ۱- ویژگی وزیکول‌های خارج‌سلولیِ مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری*. (A). آنالیز محتوای پروتئینیِ وزیکول‌ها با استفاده از ۱۲٪ SDS-PAGE و سپس مشاهده با رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو انجام شد. جرم مولکولی (برحسب کیلودالتون) توسط خطوط سمت چپ نشان داده شده است. وزن مولکولی وزیکول‌های استخراج‌شده در محدودهٔ ۱۰-۱۷۰ کیلودالتون بود. (B). تصاویر TEM از وزیکول‌های جداشده، شکل کروی آن‌ها را نشان می‌دهد که عاری از هرگونه آلودگی مانند اجزای باکتریایی و اجسام پروتئینی هستند.



شکل ۲- ارزیابی اثرهای وزیکول‌های مشتق‌شده 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 و ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت به سلول‌های HepG2 اضافه شد. وزیکول‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور قابل‌توجهی بر کاهش زنده‌مانی سلولی اثر داشتند ($p < ۰/۰۰۰۱$ **** و $p < ۰/۰۱$ **). تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnet انجام شد. داده‌ها به‌عنوان میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است.

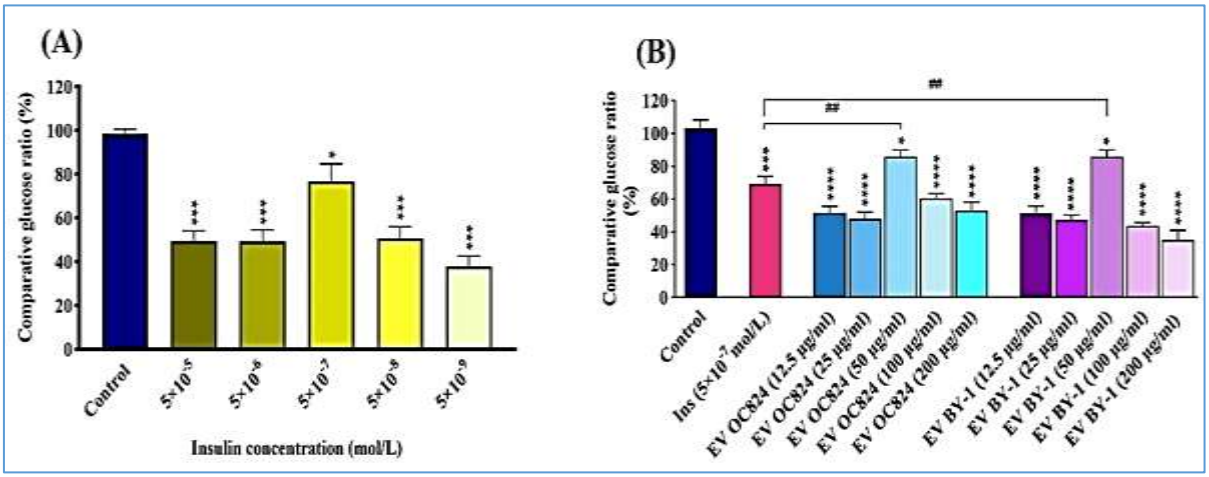
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

۳-۳- القای مدل مقاومت انسولینی در سلول‌های HepG2

برای ایجاد مدل مقاومت انسولینی، سلول‌های HepG2 به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های سریالیِ انسولین (۵×۱۰^{-۵} تا ۵×۱۰^{-۹} مول بر لیتر) قرار گرفتند. در غلظت ۵×۱۰^{-۷} مول بر لیتر انسولین، مقدار گلوکز بیشتری در محیط باقی‌مانده بود، به عبارت دیگر سلول HepG2 کمترین میزان جذب گلوکز را در طول‌موج ۵۰۵ نانومتر نشان داد که به‌عنوان نقطهٔ مقاومت انسولینی درنظر گرفته شد (شکل ۳-A).

۳-۴- تیمار سلول‌های HepG2 به‌وسیلهٔ وزیکول های خارج سلولی *هلیکوباکتر پیلوری*

بررسی جذب نوریِ گلوکز در ۵۰۵ نانومتر نشان داد که سلول‌های HepG2 تیمارشده با وزیکول‌های مشتق از *هلیکوباکتر پیلوری* در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین مصرف گلوکز را در مقایسه با مدل مقاومت انسولینی در غلظت ۵×۱۰^{-۷} مول بر لیتر انسولین نشان دادند. بنابراین وزیکول‌های خارج‌سلولی باکتری قادر به القای مقاومت به انسولین هستند (شکل ۳-B).



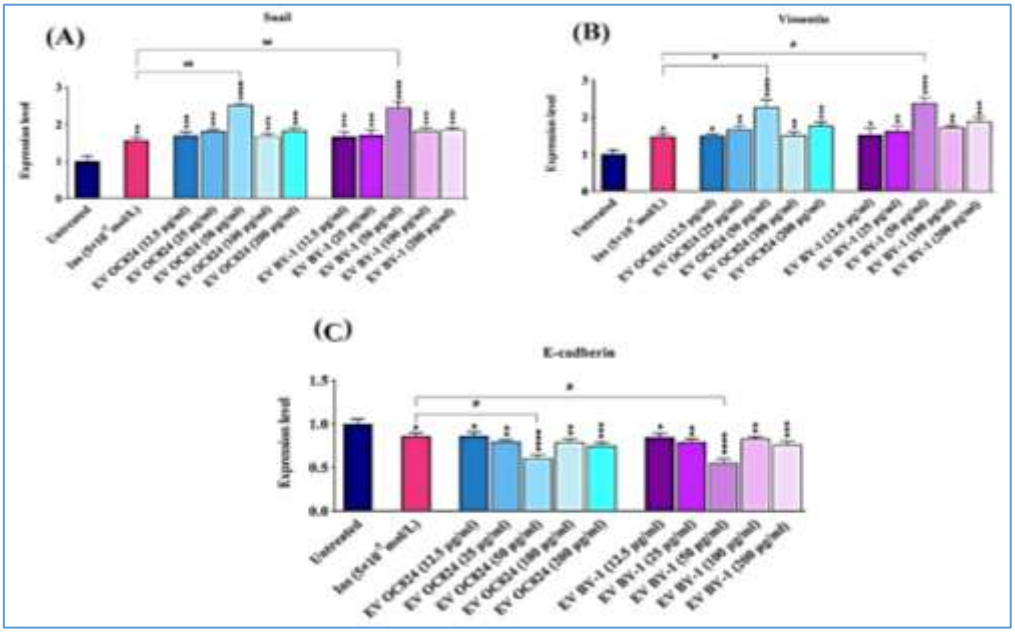
شکل ۳- (A) اثر غلظت‌های مختلف انسولین (۵×۱۰^{-۵} تا ۵×۱۰^{-۹} مول بر لیتر) بر سلول‌های HepG2. در غلظت ۵×۱۰^{-۷} مول بر لیتر انسولین، میزان گلوکز باقی‌مانده در محیط بالاتر است که نشان‌دهندهٔ نقطهٔ مقاومت به انسولین می‌باشد. (B) اثر غلظت‌های مختلف وزیکول‌های *هلیکوباکتر پیلوری* سویه‌های *OC824* و *BY-1* (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. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnet انجام شد. داده‌ها به‌عنوان میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است. $^{*}p < ۰/۰۵$، $^{**}p < ۰/۰۱$، $^{***}p < ۰/۰۰۱$ و $^{****}p < ۰/۰۰۰۱$. همچنین $^{##}p < ۰/۰۱$ برای نشان دادن معنادار بودن درنظر گرفته شد.

۳-۵- سطح بیان‌ژن‌های snail، vimentin و E-cadherin در سلول‌های HepG2 تحت‌تأثیر انسولین و وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری*

جهت بررسی اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری*، سطح بیان‌ژن‌های دخیل در فرایند EMT در سلول‌های HepG2 تعیین شد. همان‌طورکه در شکل ۴ نشان داده شده است بیان‌ژن‌های snail و vimentin در سلول‌های HepG2 در نقطهٔ مقاومت انسولینی (۵×۱۰^{-۷} مول بر لیتر) نسبت به نمونهٔ تیمارنشده افزایش معناداری داشتند ($^{**}p < ۰/۰۱$ و $^{*}p < ۰/۰۵$). در سلول‌های تیمارشده با وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (نقطهٔ مقاومت انسولینی) نسبت به نمونهٔ تیمارنشده افزایش بیان‌ژن‌ها به‌طور چشمگیری معنادار بود ($^{****}p < ۰/۰۰۰۱$). همچنین بیان‌ژن‌های snail و vimentin در سلول‌های تیمارشده با وزیکول‌های خارج‌سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به سلول‌های تیمارشده با انسولین افزایش معناداری داشتند. سایر غلظت‌های وزیکول‌های خارج‌سلولی اختلاف معناداری با نمونهٔ تیمارشده با انسولین نداشتند. بیان‌ژن E-cadherin در نقطهٔ مقاومت انسولینی (۵×۱۰^{-۷} مول بر لیتر) نسبت به نمونهٔ تیمارنشده کاهش معناداری داشت ($^{*}p < ۰/۰۵$). علاوه‌بر این در سلول‌های تیمارشده با وزیکول‌های

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

خارج‌سلولی در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با سلول‌های تیمارشده با انسولین کاهش معناداری داشت ($^{\#}p < ۰/۰۵$). سایر غلظت‌های وزیکول‌های خارج‌سلولی اختلاف معناداری با نمونهٔ تیمارشده با انسولین نداشتند.



شکل۴- اثر وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* پس از ۲۴ ساعت بر سطح بیان‌ژن‌های (A) snail، (B) vimentin و E-cadherin (C)، در فرایند EMT در سلول‌های HepG2 به‌وسیلهٔ آزمون RT-qPCR از ژن *β-actin* به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Dunnet انجام شد. داده‌ها به‌عنوان میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) از حداقل سه آزمایش مستقل ارائه شده است. $^{*}p < ۰/۰۵$، $^{**}p < ۰/۰۱$، $^{***}p < ۰/۰۰۱$ و $^{****}p < ۰/۰۰۰۱$ و همچنین $^{\#}p < ۰/۰۵$ و $^{\#\#}p < ۰/۰۱$ برای نشان دادن معنادار بودن درنظر گرفته شد.

۴- بحث

عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به‌دلیل تأثیر قابل‌توجهی که بر سلول‌های اپیتلیال معده دارد می‌تواند نقش بالقوّه‌ای در فرایند EMT داشته باشد (۲۰). EMT به‌عنوان 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 محوریِ مقاومت انسولینی در سرطان تأیید شده است. باوجوداین، ارتباط مقاومت به انسولین با انواع مختلف سرطان به‌طور کامل تاکنون نشان داده نشده است (۴۱). در سال‌های اخیر، شواهد متعددی نقش بالقوهٔ وزیکول‌های خارج‌سلولی مشتق از *هلیکوباکتر پیلوری* را در تعدیل فرایندهای سلولی برجسته کرده است (۹). امروزه *هلیکوباکتر پیلوری* به‌دلیل اینکه علاوه‌بر بیماری‌های معده در ایجاد بیماری‌های خارج از معده از جمله سندرم متابولیک و مقاومت به انسولین نیز نقش دارد؛ بسیار موردتوجه قرار گرفته است (۴۲). در فرایند EMT به‌دنبال تغییرهایی که در سلول‌های اپیتلیال رخ می‌دهد سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز نیز تحت‌تأثیر 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 خارج‌سلولیِ *هلیکوباکتر پیلوری* حاوی انکوپروتئین 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 موردبررسی قرار نگرفته است. در این مطالعه بعد از بررسی وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو مشخص شد که پروفایل پروتئینی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

وزیکول‌ها در دامنهٔ ۱۰-۱۷۰ کیلودالتون می‌باشد که مشابه با نتیجهٔ مطالعهٔ Ahmed و همکاران بود. آن‌ها نشان دادند که وزیکول‌های مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* در بازهٔ ۱۵۰-۲۵ کیلودالتون بود که در بازهٔ پروتئینیِ به‌دست‌آمده در مطالعهٔ حاضر قرار داشت (۳۵).

در این مطالعه پس از بررسیِ غلظت گلوکز در سلول‌های HepG2 تیمارشده با وزیکول‌های مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* و مقایسهٔ آن با سلول‌های HepG2 در مدل مقاومت انسولینی مشخص شد که این وزیکول‌ها قادر به القای مقاومت انسولینی در ردهٔ سلولی HepG2 هستند. این نتایج همسو با مطالعهٔ Zhou و همکاران بود که با بررسی غلظت گلوکز نشان دادند که سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در سلول‌های HepG2 دارای قابلیت القای مقاومتِ انسولینی هستند (۱۳). همچنین در مطالعهٔ دیگری توسط Chen و همکاران پس از انجام تست شاخص ارزیابیِ 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 مطالعهٔ 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 مطالعهٔ حاضر نشان داده شد که وزیکول‌های خارج‌سلولی *هلیکوباکتر پیلوری* می‌توانند با افزایش بیان‌ژن های snail، vimentin و همچنین کاهش بیان‌ژن E-cadherin در فرایند EMT در ردهٔ سلولی HepG2 نقش داشته باشند. این نتایج مشابه با یافته‌های Chang و همکارانش بود که نشان دادند سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* با افزایش بیان‌ژن‌های snail، vimentin و کاهش بیان *E-cadherin* در ردهٔ سلولی AGS قادر به القای EMT بودند (۴۴). در یک مطالعهٔ دیگر Sougleri و همکارانش نشان دادند که سویه‌های *cagA* مثبت *هلیکوباکتر پیلوری* قادر به القای EMT در ردهٔ سلولی AGS هستند. با توجه به اینکه در مطالعهٔ حاضر نیز وزیکول‌های استخراج‌شده از سویه‌های *cagA* مثبت بودند به‌نظر می‌رسد سویه‌های *cagA* مثبت نقش کلیدی‌تری در القای فرایند EMT دارند. همچنین نتایج مطالعهٔ این محققان نشان داد که بیان‌ژن‌های snail و vimentin به عنوان ژن‌های دخیل در EMT در ردهٔ سلولی AGS افزایش یافت که مشابه نتایج مطالعهٔ حاضر در ردهٔ سلولی HepG2 بود (۴۵). این شباهت ممکن است به‌دلیل فعال شدن فرایند EMT توسط TGF-β در هر دو ردهٔ سلولیِ HepG2 و AGS باشد (۴۶ و ۴۷). در مطالعهٔ دیگری، Bolori و همکارانش نشان دادند که وزیکول‌های خارج‌سلولیِ استخراج‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* قادر به افزایش بیان‌ژن‌های snail ، vimentin و کاهش بیان‌ژن E-cadherin در ردهٔ سلولی LX-2 بودند. همچنین این نتایج همسو با مطالعهٔ حاضر بود. شباهت این یافته‌ها در این دو ردهٔ سلولیِ کبدیِ مختلف می‌تواند به‌دلیل فعال شدن مسیر TGF-β/SMAD باشد که در تنظیم بیان‌ژن‌های دخیل در فرایند EMT در رده‌های سلولیِ HepG2 و LX-2 نقش دارند (۴۸ و ۴۹).

۵- نتیجه‌گیری

وزیکول‌های مشتق‌شده از *هلیکوباکتر پیلوری* دارای قابلیت القای مقاومت انسولینی در ردهٔ سلولیِ HepG2 هستند و می‌توانند با افزایش بیان‌ژن‌های snail ، vimentin و کاهش بیان‌ژن E-cadherin در فرایند EMT در این ردهٔ 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 کلیهٔ کارکنان آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، واقع در پژوهشکدهٔ بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی و همچنین گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم‌وتحقیقات تهران صمیمانه تشکر می‌کنند.

۸- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند تعارض منافعی وجود ندارد.

۹- سهم نویسندگان

غزاله طالبی: اجرای بخش عملی پژوهش، تحلیل و تفسیر داده ها 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 داده ها و نگارش و ویرایش نهایی مقاله.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

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):e128.۷۷
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-Monterrosas 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/GSK3β 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

20. Baj J, Korona-Głowniak 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;3.۶۳-۵۵۳:(۵)۶
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 Aghdaei 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 Aghdaei 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]

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. 20.۱۱۱۳۷:(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-β1-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 β1 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. Kahnamouei 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-01-30]