



Scan online to view this article

Evaluation of *GPR83* Gene Expression in AGS Cells Transfected with Pflag-CMV-3-*TagD* Recombinant Vector

Fariba Heidari¹, Abbas Doosti *²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Abstract

Aim and Background: *Helicobacter pylori* infection is a major cause of gastric cancer in humans. The *Helicobacter pylori tagD* gene, which encodes the thiol peroxidase enzyme, plays an important role in bacterial colonization in the human stomach wall. Research has shown that the *GPR83* gene in gastric cancer increases expression, and the aim of this study was to investigate the expression of the *GPR83* gene in AGS cells transfected with the recombinant pFLAG-CMV-3-*tagD* vector by Real Time PCR.

Materials and methods: AGS cells were transfused using lipofactamine solution and plasmid carrying the *tagD* gene encoding *Helicobacter pylori* or empty plasmid (control). RNA extraction was then performed from cultured cells and cDNA synthesis was performed, and then the eukaryotic expression of *Helicobacter pylori* gene *tagD* in AGS cells was investigated by RT-PCR method. The expression of *GPR83* genes was evaluated by Real Time PCR method. It should be noted that the enoxin kit was used to evaluate apoptosis, and finally the expression of each gene was evaluated using SPSS software and t-test Independent statistical tests.

Results: Results: The findings from gene expression analysis showed that the expression of *GPR83* gene in AGS cells treated with *tagD* increased compared to control cells, but this increase in expression was not statistically significant ($P = 0.0888$).

Conclusion: Overall, the data obtained from this study showed that *GPR83* gene expression is altered in cells treated with the *Helicobacter pylori tagD* gene and seems to play a role in the expression of *Helicobacter pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *tagD*, *GPR83*, AGS, IAU science.

Corresponding author:

Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: abbasdoosti@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

pFLAG-CMV-3-tagD

فریبا حیدری^۱، عباس دوستی^{۲*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عفونت هلیکوباترپیلوری از عوامل اصلی ایجاد کننده سرطان معده در انسان است. ژن *tagD* هلیکوباترپیلوری که کننده آنزیم تیول پروکسیداز است، نقش مهمی در کلونیزه شدن باکتری در جدار معده انسان ایفا می کند. تحقیقات نشان داده است که ژن *GPR83* در سرطان معده افزایش بیان دارند و هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان ژن *GPR83*، در سلول های سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS adenocarcinoma gastric cell line) ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب- pFLAG به روش Real Time PCR است.

مواد و روش ها: سلول های AGS به کمک محلول لیپوفکتامین و با پلاسمید حامل ژن کننده *tagD* هلیکوباترپیلوری یا پلاسمید خالی (کنترل)، ترانسفکت شدند. سپس استخراج RNA از سلول های کشت داده شده انجام شد و سنتز cDNA صورت پذیرفت و سپس بیان یوکاریوتی ژن *tagD* هلیکوباترپیلوری در سلول های AGS با روش RT-PCR بررسی شد. میزان بیان ژن های *GPR83*، با روش Real Time PCR ارزیابی گردید. لازم به ذکر است که برای بررسی آپوپتوز از کیت انکسین استفاده شد و در نهایت با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری t-test Independent بیان هر یک از ژن ها بررسی شد.

یافته ها: یافته های به دست آمده از آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان ژن *GPR83* در سلول های AGS تیمار شده با *tagD* نسبت به سلول های کنترل افزایش بیان داشت اما این افزایش بیان از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P=0.0888$).

نتیجه گیری: به طور کلی، داده های به دست آمده از این تحقیق حاکی از آن بود که بیان ژن *GPR83* در سلول های تحت تیمار با ژن *tagD* هلیکوباترپیلوری، تغییر می یابد و به نظر می رسد که ژن *GPR83* هلیکوباترپیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش دارد.

واژه های کلیدی: هلیکوباترپیلوری، *GPR83*, *tagD*, IAU science, AGS

مقدمه

سرطان در اثر یکسری رویدادهای مولکولی و تغییرهای

بنیادین در ویژگی های عادی سلول ایجاد می شود (۱). سرطان معده چهارمین نوع سرطان است و دومین علت مرگ سرطان در جهان است. تحقیقات حاکی از آن است که شرق آسیا شامل یک منطقه خطرناک برای سرطان معده در صورتی شمال آمریکا، استرالیا، نیوزیلند و غرب و شمال آفریقا مناطقی هستند که خطر کمتری دارند. شایع ترین نوع سرطان معده آدنوکارسینوما است که هر ساله باعث مرگ ۷۵۰ هزار نفر می شود (۲). این سرطان یکی از شایع ترین بد خیمی ها در سرتاسر جهان است و جزء بیماری های چند عاملی (Multifactorial) دسته بندی می شود و عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی به عنوان مارکرهای خطر برای ابتلا به سرطان معده معرفی شده اند (۳،۴). سرطان معده به واسطه

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

در شرایط استرس اکسیداتیو معده بازی می‌کند. تیول پراکسیداز یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های پراکسی-ریدوکسین بوده و از فراوان ترین آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی در باکتری‌ها محسوب می‌شود. (۱۵-۱۷).

ژن *GPR83* (*G protein-coupled receptor*) یا گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G گروه بزرگی از گیرنده‌های پروتئینی هستند که در سطح خارجی غشاء سلول‌ها قرار دارند و پس از اتصال با لیگاند خود (مانند آدنوزین، اپیوپا آدنالین) تغییر شکل داده و فعال می‌شوند. ژن *GPR83* در انسان در موقعیت ۱۱q21 قرار گرفته و از ۱۱ اگزون تشکیل شده است (۱۸). در حضور هلیکوباکتر پیلوری، سلول‌های اپی تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند. به طور مثل وقتی محققان سلول‌های رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکتر پیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن‌های *CA1*, *GPR83*, *TNF*, *VPR2*, *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن‌های *AWP1*, *WTAP*, *DDB2*, *M17S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند (۱۹).

با توجه به این که بیان ژن *GPR83* در سرطان از اهمیت بالایی برخوردار هستند در این پژوهش به بررسی بیان ژن ذکر شده در سلول‌های رده سرطان معده AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3-tagD پرداخته شد.

روش کار

مدت زمان اجرا، رده سلولی AGS و کشت

تحقیق حاضر در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. مدت زمان اجرای تحقیق از دی ماه ۱۳۹۷ تا خرداد ماه ۱۳۹۸ به طول انجامید. در این تحقیق از سلول‌های سرطانی معده رده AGS استفاده شد (۲۰) که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد تهیه شد.

در مرحله اول محیط کشت پایه ۱۶۴۰ RPMI به محیط کشت کامل تبدیل شد که به این منظور، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم (Pen-strep) بر میلی‌لیتر به محیط پایه اضافه شد. سپس برای انجام شمارش سلولی، ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول و ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط شد و روی لام نئوبار قرار

چند ویژگی از دیگر سرطان‌ها متمایز می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها ارتباط آن با عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. این ویژگی سرطان معده را جزء محدود سرطان‌هایی قرار می‌دهد که عامل عفونی به طور کامل شناخته شده دارند. علت دوم پیچیدگی علت شناسی سرطان معده، روند التهاب‌زائی عفونت باکتریائی و اثر پاسخ التهابی بدن بر مستعد ساختن سلول‌های بافت معده برای سرطانی شدن است که این مستعد بودن سلول‌ها خود ناشی از زمینه ژنتیکی فرد است (۵)، به طوری که افرادی که سیستم ایمنی قوی‌تری دارند و پاسخ التهابی شدیدتری در مقابل عفونت هلیکوباکتر ایجاد می‌کنند، از یک سو، قابلیت بهبودی بهتر و سریع تر عفونت را دارند و از سوی دیگر، خطر تشدید التهاب آسیب به بافت معده و تحریک سلول‌های مخاط معده به سمت سرطانی شدن، آن‌ها را تهدید می‌نماید (۶).

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل (Microaerophile) و کند رشد است که اصولاً مارپیچی شکل است و می‌تواند به صورت کروی هم تغییر شکل یابد. این باکتری دارای فلاژل یا تازک است و حالت باکتریمی (bacteriaemia) ندارد، یعنی قادر به ورود به سیستم گردش خون انسان نیست. هلیکوباکتر پیلوری دارای مشخصات نیایی به صورت، شاخه پروتئوباکتریا، رده اپسیلوون پروتئوباکتریا، راسته کامپیلوباکتریا و خانواده هلیکوباکتر است (۹-۷). این باکتری به دلیل ویژگی‌های خاص از جمله تولید آنزیم اوره‌آز قادر به زیستن در بافت پوششی معده انسان است، چرا که با آنزیم اوره‌آز خود، اوره را به آمونیاک و دی‌اکسیدکربن هیدرولیز می‌کند. آمونیاک از طرفی با خنثی کردن اسید معده زمینه رشد و بقاء باکتری را فراهم می‌کند و از طرف دیگر با تخریب مخاط معده موجبات التهاب و زخم معده را فراهم سازد (۱۰). در تحقیقات انجام شده ارتباط بین آلدگی با هلیکوباکتر پیلوری و بیماری خود اینمی تیروئید در جمعیت آسیایی و به خصوص کره ای‌ها به اثبات رسیده است که این ارتباط بیشتر در سنین بالای ۱۶ سال دیده می‌شود (۱۳-۱۱). از طرفی هلیکوباکتر پیلوری علاوه بر التهاب مزمن و زخم معده و اثنی عشر، در مواردی منجر به سرطان بافت موکوزی معده به همراه لنفومای آن می‌شود (۱۴). ژن *tagD* در هلیکوباکتر پیلوری یک آنزیم به نام تیول پراکسیداز را رمز-گذاری می‌کند که دارای ۱۶۶ اسید‌آمینه است. تیول پراکسیداز یکی از ادھسین‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری است و در تجمع این باکتری در مخاط معده انسان نقش اساسی دارد. این ژن نقش مؤثر و فعالی را در زنده ماندن هلیکوباکتر پیلوری

گرفت و توسط لام سنتگین لام‌گذاری شد. لام زیر میکروسکوپ و با عدسی $\times 10$ مشاهده شد. تعداد سلول‌ها در چهار مریع بزرگ واقع در چهار گوشه صفحه مدرج شمارش و میانگین گرفته شد. بعد از مرحله رشد نمودن سلول‌ها و پوشاندن ۸۰ تا ۹۰ درصد کف فلاسک، اقدام به برداشت سلول‌ها به منظور فریز شد.

تکثیر پلاسمید pFLAG-CMV-3-tagD

در پژوهش حاضر برای بررسی میزان بیان ژن *GPR83* سلول‌های AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3-tagD از پلاسمید CMV-3-tagD استفاده شد (۱۵). پلاسمید نوترکیب ۳ حامل ژن *tagD* باکتری هلیکوباتریپلیوری و هم‌چنین پلاسمید pFLAG-CMV-3 به عنوان ژن خارجی است که همان‌طور که اشاره شد از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شد. تکثیر پلاسمید با انتقال آن به میزبان باکتریایی که به‌طور عمده شامل سویه‌های مناسب از باکتری اشتریشیاکلی است، انجام شد. لازمه ذکر است که جهت انجام ترانسفورماسیون باکتری *E.coli* با پلاسمید، در سلول مستعد ساخته شد و پس از رشد کلنی‌های باکتریایی، تعداد ۱۰ عدد از آن‌ها به صورت کامل تصادفی انتخاب شده و روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک به صورت ماتریکس کشت داده شدند. پلیت ماتریکس به‌منظور رشد باکتری‌ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Favorgene ساخت کشور تایوان) انجام شد. در مرحله نهایی برای تأیید صحت پلاسمید استخراج شده و PCR بررسی حضور ژن کلون شده (*tagD*) در آن از تکنیک استفاده شد. از سوی دیگر پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق (سیناکلون ساخت شرکت دانش بنیان) برای ژن *tagD* در این مرحله برای پرایمر Forward ۵'-*3'* ۳'-*3'* Reverse پرایمر CCAACAGCACACCGTAATTTCC بود که سایز باند آن ۵۳۷ bp بود. لازمه ذکر است که بعد از انجام تکنیک PCR ساخت کشور آلمان) تأیید پلاسمید نوترکیب به‌روش هضم آنزیمی صورت گرفت. برای تأیید حضور ژن *tagD* در پلاسمید pFLAG-CMV-3، از هضم آنزیمی EcoRV و BglIII دوگانه استفاده شد و آنزیم محدودالاثر

مورد استفاده قرار گرفت.

روش انتقال پلاسمید به سلول

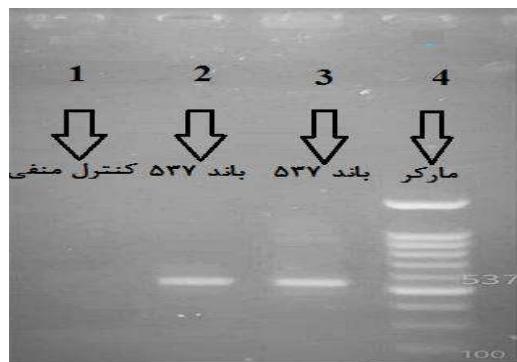
در پژوهش حاضر برای انتقال پلاسمید به سلول، سلول‌های AGS درون فلاسک T25 کشت داده شدند و زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند از آن‌ها رسوپ سلولی تهیه شد. هم‌چنین سوسپانسیون سلولی در ۱ میلی لیتر از محیط کشت تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون همراه با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو روی لام نئوبار قرار گرفت و لام‌گذاری شمارش شد. سپس تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد و از سلول‌های گروههای تیمار و شاهد رسوپ گیری صورت گرفت.

تشخیص آپوپتوز

در تحقیق حاضر برای تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده از کیت انکسین V (زیست‌فرآورده ساخت کشور آلمان) برای تجزیه و تحلیل سریع مراحل مختلف آپوپتوز استفاده شد. انکسین V به فسفاتیدیل سرین (PS) متصل می‌شود که در قسمت داخلی غشاء سیتوپلاسمی در سلول‌های سالم قرار دارد. اما پس از شروع آپوپتوز، PS به سرعت در قسمت بیرونی غشاء سیتوپلاسمی جای‌جا می‌شود که تصور می‌شود در تشخیص ماکروفاژ نقش مهمی را ایفا می‌کند، بنابراین سلول‌های آپوپتوز را می‌توان به سرعت فاگوسیتیوز کرد. اتصال انکسین V به PS وابسته به Ca_2 است و یک بافر واکنش حاوی Ca_2 خاص در طول فرآیند اتصال مورد نیاز است. کیت تشخیص آپوپتوز MabTag شامل propidium ییدید است که باعث شناسایی سلول‌ها از یکدیگر می‌شود. لازمه ذکر است که برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus (شرکت سیناکلون) استفاده شد و روش DNase treatment و سنتز cDNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آرما) صورت گرفت. هم‌چنین برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن *GAPDH* انجام شد. از طرفی جهت تعیین دمای دقیق Anneling پرایمراهای PCR با پرایمراهای مناسب انجام گرفت که توالی پرایمراهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. در نهایت محصول‌های PCR روى ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. سپس با نور UV مشاهده و تصویری تهیه شد.

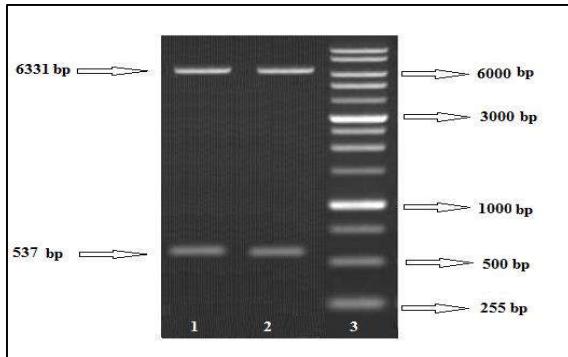
تکنیک Real time RT-PCR

برای بررسی میزان تغییر بیان در ژن موردنظر در سلول‌های رده سلولی AGS در دو سلول ترانسفکت شده و کنترل، از جفت پرایمراهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام ساخت کشور استرالیا) Real Time PCR استفاده



شکل ۱ نتایج PCR بر روی پلاسمید استخراج شده که حضور باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *tagD* صحت استخراج پلاسمید را تأیید کرد. چاهک شماره ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک شماره ۱ کنترل منفی است.

در این تحقیق انجام برش آنزیمی با دو آنزیم *Bgl*III و *pFLAG-CMV-3-tagD* روی پلاسمید نوترکیب *Eco*RV سبب تشکیل دو باند ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به پلاسمید و باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *tagD* شد که در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲ - هضم آنزیمی وکتور حاوی ژن *tagD*. قطعه نگین ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور و قطعه ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *tagD* است که چاهک سه مارکر است و دو چاهک دیگر سایز باند مورد نظر را نشان می-دهند.

نتایج بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت انکسین

همان طور که اشاره شد در طی فرآیند آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا منتقل می‌شود که آنکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده شود. نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری است. نتایج حاصل از آن در شکل های ۳ و ۴

جدول ۱- اطلاعات و مشخصات پرایمرها

نام ژن	توالی پرایمر	دماي اتصال	اندازه محصول
<i>GPR83</i>	F: 5' - TTTCACTCCCCA CATGCTATCTGC -3' R: 5' - CAGAGATGATG AGGAGGGGCAG -3'	64	171 bp
<i>GAPDH</i>	F: 5' - AAATCCCACCA CCATCTTCCAG -3' R: 5' - CAGAGATGA TGACCCTTTGGC -3'	65	183 bp

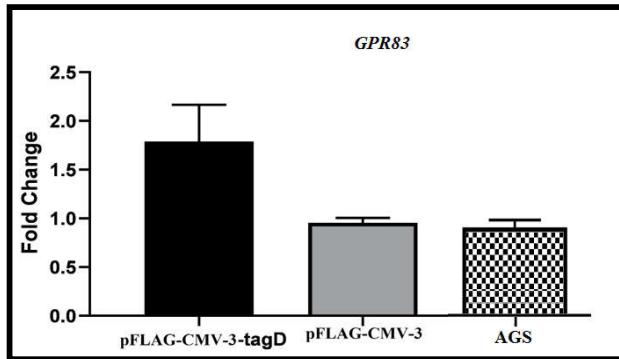
شد (۲۱). لازمه ذکر است که برای بررسی میزان تغییر بیان ژن خانه دار *GAPDH* به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. مواد به نسبت های ۰/۴ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت، cDNA (۲۵(ng/ μ L) ۲ میکرولیتر، SYBR Green master mix (۲X) ۷/۵ میکرولیتر و ۴/۷ ddH₂O ۴ مخلوط گردید و سپس درون دستگاه قرار داده شد. برنامه دمایی و زمانی تأیید شده در این مرحله به این صورت بود که برای Primary Denaturasion ۳ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۰ Denaturation ۲۰ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۵ Annealing Extension ۲۵ ثانیه و ۶۴ درجه سانتی گراد و ۲۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد و تعداد چرخه های این تکنیک ۴۵ در نظر گرفته شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها

با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و آزمون های آماری - t test Independent test بیان ژن مورد نظر بررسی و مقایسه شد که اگر $p\text{-Value} \leq 0.05$ باشد، تفاوت داده ها از لحاظ آماری معنی دار محسوب می گردد.

نتایج

تأیید صحت پلاسمیدها به روش PCR و هضم آنزیمی با انجام PCR به وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن *TagD*, باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به این ژن روی ژل آگاراز دیده شد. نتیجه این آزمایش در شکل ۱ دیده می شود.



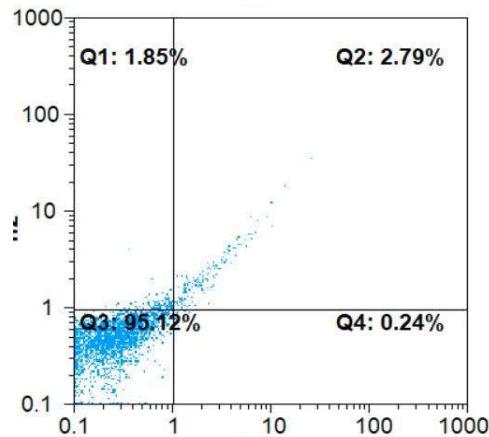
شکل ۷- آنالیز آماری بیان ژن GPR83 . بیان ژن GPR83 در گروه مورد آزمایش (دریافت کننده ژن tagD) نسبت به گروه کنترل افزای

بحث

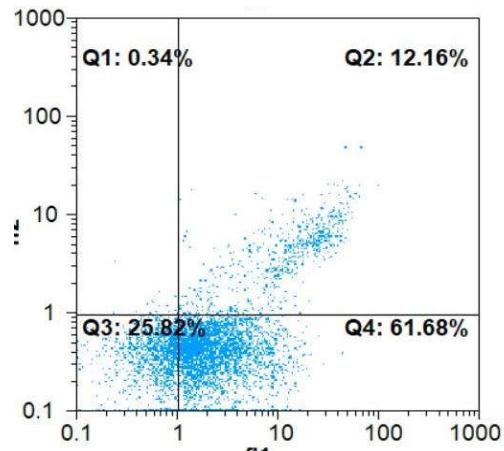
هلیکوباترپیلوری یک باکتری باسیلی شکل کوچک گرم منفی با حرکت بسیار زیاد است که در لایه مخاطی معده انسان، عفونت ایجاد می‌نماید. عفونت این باکتری می‌تواند در کودکی ایجاد شود اما میزان شیوع آن با افزایش سن رابطه مستقیم دارد و بیشتر موارد آن بدون علامت است لیکن در صورت ادامه روند عفونت، ۱۰ تا ۱۵ درصد افراد دچار زخم معده یا سرطان معده خواهند شد (۲۲،۲۳). در حضور هلیکوباترپیلوری سلول‌های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند که در این راستا مطالعه‌هایی صورت گرفته است به عنوان مثال در سال ۲۰۱۷، گروهی از محققان به سرپرستی Safarpour مطالعه‌هایی را روی ژن tagD هلیکوباترپیلوری انجام دادند. این محققان ژن tagD هلیکوباترپیلوری را که به طول ۵۳۷ جفت باز است را با روش واکنش PCR تکثیر نموده و محصول‌های PCR را در وکتور پیش‌بازاریوتی یوکاریوٹی PFLAG-CMV-3 کلون نمودند. بیان شونده یوکاریوٹی PFLAG-CMV-3 به رده سلول‌های سپس وکتور نوترکیب حامل ژن tagD به رده سلول‌های CHO منتقل گردید و بیان آن با روش‌های RT-PCR و SDS-PAGE بررسی شد و نتایج نشان داد که بیان این ژن موفقیت آمیز بود (۱۵). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز حاکی از آن بود که بیان ژن GPR83 در سلول‌های تحت تیمار با ژن tagD هلیکوباترپیلوری، تغییر می‌یابد و با توجه به نتایج ما، به نظر می‌رسد، ژن GPR83 هلیکوباترپیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته باشد.

در سال ۲۰۰۷ Kim و همکاران نشان دادند که در اثر کشت سلول‌های رده سرطان معده AGS و سپس افزودن هلیکوباتر زنده به محیط کشت این گونه سلول‌ها، بیان تعداد

نشان داده شده است. در شکل ۳ درصد سلول‌های زنده مشاهده می‌شود و در ناحیه Q3 ۹۵ درصد بیشتر از سایر گروه‌ها است. در شکل ۴ درصد سلول‌های آپاپتوز شده جوان در ناحیه Q4 یعنی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپاپتوز به ۶۱/۶۸ درصد رسیده است. به علاوه درصد سلول‌های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی در ناحیه Q2 ۱۲/۱۶ درصد بود.



شکل ۳- نتایج بررسی آپاپتوز به روش فلوسایتمتری در گروه کنترل



شکل ۴- نتایج بررسی آپاپتوز به روش فلوسایتمتری در گروه تیمار

بررسی آماری

نتایج آنالیز آماری مربوط به ژن GPR83 به وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه یا به- عبارتی نمونه ژن مورد نظر و نمونه ژن کنترل داخلی، به صورت جداگانه برای انجام آنالیز و به دست آوردن تغییر بیان یادداشت گردید که نتایج حاصل از آن در شکل ۷ آورده شده است. در این آنالیز تغییر بیان ژن GPR83 نسبت به گروه PFLAG و AGS و CMV-3 افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری معنا دار نبود.

حاضر نشان داد که بیان ژن *GPR83* در سلول های تحت تیمار با ژن *tagD* هلیکوباکترپیلوری، تغییر می یابد و با توجه به نتایج ما، به نظر می رسد، ژن *GPR83* هلیکوباکترپیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته باشد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد است و بدین وسیله از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را دارد.

زیبادی از ژن ها در سلول های سرطانی تحت تأثیر قرار می گیرد. به طوری که در ژن های *CA1*, *TNF*, *VPR2*, *GPR83*, *IL1B* و *IL8* افزایش بیان و در ژن های *WTAP*, *AWP1*, *DDB2* و *ARF3* کاهش بیان دیده می شود (۱۹). نتایج این بررسی حاضر نیز حاکی از آن بود که در حضور هلیکوباکترپیلوری، سلول های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان می دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می دهند. در سال ۲۰۰۷ Majidi و گروهی از محققانش در مورد ارتباط هلیکوباکترپیلوری با پیدایش سرطان سلول سنگفرشی حنجره و هیپوفارکس تحقیق کردند. نتایج تحقیقات آن ها نشان داد که در افراد مبتلا به سرطان نسبت به افراد سالم (گروه شاهد)، عفونت هلیکوباکتر شیوع بالاتری دارد (۲۴). در تحقیق حاضر مشاهده شد در حضور هلیکوباکترپیلوری، سلول های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان می دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می دهند. در سال ۲۰۰۸ گروهی از محققان به سرپرستی Matsuda تأثیر هلیکوباکترپیلوری بر بیان ژن های متعددی از سلول های سرطانی دستگاه گوارش را در سطح mRNA بررسی نمودند که نتایج نشان داد در سلول های MKN45 بیان ژن های *MUC2*, *MUC5AC* و *CDX2* مهار شد (۲۵). نتایج این بررسی حاکی از آن بود که در حضور هلیکوباکترپیلوری، سلول های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان می دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می دهند. مثلاً وقتی محققان سلول های رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکترپیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن های *TNF*, *VPR2*, *GPR83*, *CA1* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن های *IL1B* و *ARF3* کاهش بیان دارند. در سلول های *DDB2*, *AWP1*, *WTAP* و *M17S2* نتایج مبتدا به سرطان نشان دادند.

نتیجه گیری

در حضور هلیکوباکترپیلوری، سلول های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان می دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می دهند به عنوان مثال طی تحقیقی دانشمندان سلول های رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکترپیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن های *GPR83*, *CA1*, *TNF*, *VPR2*, *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن های *M17S2*, *DDB2*, *AWP1*, *WTAP* و *ARF3* کاهش بیان دارند. به طور کلی، نتایج حاصل از تحقیق

منابع

- 1- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(12):895.
- 2- Association JGC. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3). *Gastric cancer*. 2011;14(2):113-23.
- 3- Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. *Cancer Epigenetics*: Springer; 2012. p. 411-35.
- 4- Huang J-Q, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. 1998;114(6):1169-79.
- 5- Nguyen T, Nguyen V, Phan T, Hong Ha T, Anh Le TL PD. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection in Tay children in Vietnam. *Ann Clin Lab Res*. 2016;4(04):1-22.
- 6- Burucoa C, Axon A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 2017;22e12403.
- 7- Malfertheiner P, Megraud F, O'morain C, Gisbert J, Kuipers E, Axon A, et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*. 2017;66(1):6-30.
- 8- Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(15):1175-86.
- 9- Rain J-C, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, et al. The protein–protein interaction map of Helicobacter pylori. *Nature*. 2001;409(6817):211.
- 10- Amieva M, Peek Jr RM. Pathobiology of Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2016;150(1):64-78.
- 11- Graham DY. Helicobacter pylori update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*. 2015;148(4):719-31. e3.
- 12- Cover TL. Helicobacter pylori diversity and gastric cancer risk. *MBio*. 2016;7(1):e01869-15.
- 13- Katelaris PH, Forbes GM, Talley NJ, Crotty B, Pylori FTAPH, Group S. A randomized comparison of quadruple and triple therapies for Helicobacter pylori eradication: The QUADRATe Study. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1763-9.
- 14- Liu X, Ji Q, Zhang C, Liu X, Liu Y, Liu N, et al. miR-30a acts as a tumor suppressor by double-targeting COX-2 and BCL9 in H. pylori gastric cancer models. *Scientific reports*. 2017;7(1):7113.
- 15- Safarpour M, Kazemi Z, Doosti E, Doosti A. Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*. 2016;14(4).
- 16- Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential proteomic analysis of human saliva using tandem mass tags quantification for gastric cancer detection. *Scientific reports*. 2016;622165.
- 17- Inoue H, Sakurai T, Ujike S, Tsuchiya T, Murakami H, Kanazawa H. Expression of functional Na⁺/H⁺ antiporters of Helicobacter pylori in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. *FEBS letters*. 1999;443(1):11-6.
- 18- Hansen W, Loser K, Westendorf AM, Bruder D, Pfoertner S, Siewert C, et al. G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+ CD25- T cells leads to the induction of Foxp3+ regulatory T cells in vivo. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):209-15.
- 19- Kim N, Park W-Y, Kim JM, Park YS, Lee DH, Park JH, et al. Analysis of gene expression profile of AGS cells stimulated by Helicobacter pylori adhesion. *Gut and liver*. 2007;1(1):40.

- 20- Zhang Y, Peng Z, Zhao Y, Chen L. microRNA-25 inhibits cell apoptosis of human gastric adenocarcinoma cell line AGS via regulating CCNE1 and MYC. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* 2016;221415.
- 21- Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegner J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Briefings in bioinformatics.* 2015;17(2):204-12.
- 22- Soltani J, Amirzadeh J, Nahedi S, Shahsavari S. Prevalence of helicobacter pylori infection in children, a population-based cross-sectional study in west iran. *Iranian journal of pediatrics.* 2013;23(1):13.
- 23- Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghigat M, Hayati M, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (south of Iran). *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2006;54(4):259-61.
- 24- Majidi MR, Rezaei S, Hassanzadeh N, Esmaelzadeh A, Babaeian M, Norizade N. The correlation between helicobacter pylori infection and squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx. *Iranian Journal of Otorhinolaryngology.* 2007;19(48):89-94.
- 25- Matsuda K, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of Helicobacter pylori on the expressions of SOX2, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2008;43(1):25-33.

