NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/39 , 2020

Scan online to view this article

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

Fariba Heidari[1], 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 Indepent 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۹ تابستان ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی

ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب 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

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

چکیده

سابقه و هدف: عفونت *هلیکوباکترپیلوری* از عوامل اصلی ایجادکننده سرطان معده در انسان است. ژن *tagD هلیکوباکترپیلوری* که کد کننده آنزیم تیول پروکسیداز است، نقش مهمی در کلونیزه‌شدن باکتری در جدار معده انسان ایفا می‌کند. تحقیقات نشان داده است که ژن *GPR83* در سرطان معده افزایش بیان دارند و هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان ژن *GPR83*، در سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده (adenocarcinoma gastric cell line یا AGS) ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3-*tagD* به‌روش Real Time PCR است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های AGS به کمک محلول لیپوفکتامین و با پلاسمید حامل ژن کد کننده *tagD هلیکوباکتر پیلوری* یا پلاسمید خالی (کنترل)، ترانسفکت شدند. سپس استخراج RNA از سلول‌های کشت داده شده انجام شد و سنتز cDNA صورت پذیرفت و سپس بیان یوکاریوتی ژن *tagD هلیکوباکترپیلوری* در سلول‌های AGS با روش RT-PCR بررسی شد. میزان بیان ژن‌های *GPR83*، با روش Real Time PCR ارزیابی گردید. لازم‌به ذکر است که برای بررسی آپوپتوز از کیت انکسین استفاده شد و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری t-test Indepent بیان هر یک از ژن‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌های به‌دست آمده از آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان ژن *GPR83* در سلول‌های AGS تیمار شده با *tagD* نسبت‌به سلول‌های کنترل افزایش بیان داشت اما این افزایش بیان از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P= 0.0888).

نتیجه‌گیری: به طور کلی، داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق حاکی از آن بود که بیان ژن *GPR83* در سلول‌های تحت تیمار با ژن *tagD هلیکوباکترپیلوری*، تغییر می‌یابد و به‌نظر می‌رسد که ژن *GPR83 هلیکوباکترپیلوری* در ایجاد این تغییر بیان نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری*، *tagD*، *GPR83*، AGS، IAU science

مقدمه

سرطان در اثر یک‌سری رویدادهای مولکولی و تغییرهای بنیادین در ویژگی‌های عادی سلول ایجاد می‌شود (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. شایع‌ترین نوع سرطان معده آدنوکارسینوما است که هر ساله باعث مرگ ۷۵۰ هزار نفر می‌شود (۲). این سرطان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سرتاسر جهان است و جزء بیماری‌های چند عاملی (Multifactorial) دسته‌بندی می‌شود و عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی به‌عنوان مارکرهای خطر برای ابتلا به سرطان معده معرفی شده‌اند (۳،۴). سرطان معده به‌واسطه

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

چند ویژگی از دیگر سرطان‌ها متمایز می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها ارتباط آن با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* است. این ویژگی سرطان معده را جزء معدود سرطان‌هایی قرار می‌دهد که عامل عفونی به‌طورکامل 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)، به‌طوری‌که 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).

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل (Microaerophile) و کند رشد است که اصولا مارپیچی شکل است و می تواند به‌صورت کروی هم تغییر شکل یابد. این باکتری دارای فلاژل یا تاژک است و حالت باکتریمی (bacteraemia) ندارد، یعنی قادر به ورود به سیستم گردش خون انسان نیست. *هلیکوباکترپیلوری* دارای مشخصات نیایی به‌صورت، شاخه پروتئوباکتریا، رده اپسیلون پروتئوباکتریا، راسته کامپیلوباکتریا و خانواده هلیکوباکتر است (۷-۹). این باکتری به‌دلیل 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 دی اکسیدکربن 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 آلودگی با *هلیکوباکترپیلوری* و بیماری خود ایمنی تیروئید در جمعیت آسیایی و به‌خصوص کره ای‌ها به اثبات رسیده است که این ارتباط بیش‌تر در سنین بالای ۱۶ سال دیده می‌شود (۱۳-۱۱). از طرفی *هلیکوباکترپیلوری* علاوه بر التهاب مزمن و زخم معده و اثنی‌عشر، در مواردی منجربه سرطان بافت موکوزی معده به‌همراه لنفومای آن می‌شود (۱۴). ژن *tagD* در *هلیکوباکترپیلوری* یک آنزیم به نام تیول پراکسیداز را رمز-گذاری می‌کند که دارای ۱۶۶ اسیدآمینه است. تیول پراکسیداز یکی از ادهسین‌های مهم *هلیکوباکترپیلوری* است و در تجمع این باکتری در مخاط معده انسان نقش اساسی دارد. این ژن نقش مؤثر و فعالی را در زنده ماندن *هلیکوباکترپیلوری* در شرایط استرس اکسیداتیو معده بازی می‌کند. تیول پراکسیداز یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های پراکسی-ریدوکسین بوده و از فراوان‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در باکتری‌ها محسوب می‌شود. (۱۷-۱۵).

ژن *GPR83* (G protein–coupled receptor) یا گیرنده-های جفت شونده با پروتئین G گروه بزرگی از گیرنده‌های پروتئینی هستند که در سطح خارجی غشای سلول‌ها قرار دارند و پس از اتصال با لیگاند خود (مانند آدنوزین، اپیوم یا آدرنالین) تغییر شکل داده و فعال می‌شوند. ژن *GPR83* در انسان در موقعیت 11q21 قرار گرفته و از ۱۱ اگزون تشکیل شده است (۱۸). در حضور *هلیکوباکتر پیلوری*، سلول های اپی تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند. به‌طور مثل وقتی محققان سلول‌های رده سرطان معده AGS را با *هلیکوباکترپیلوری* آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن‌های *CA1*، *GPR83*، *VPR2*، *TNF*، *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن‌های *WTAP*، *AWP1*، *DDB2*، *M17S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند (۱۹).

با توجه‌به 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 به‌طول 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 RPMI 1640 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

گرفت و توسط لامل سنگین لامل‌گذاری شد. لام زیر میکروسکوپ و با عدسی ۱۰× مشاهده شد. تعداد سلول‌ها در چهار مربع 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* سلول های AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3-*tagD* از پلاسمید pFLAG-CMV-3-*tagD* استفاده شد (۱۵). پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3 حامل ژن *tagD* باکتری *هلیکوباکترپیلوری* و هم‌چنین پلاسمید pFLAG-CMV-3 بدون 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 *اشریشیاکلی* است، انجام شد. لازم‌به 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 به‌صورت کامل تصادفی انتخاب شده و روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک به‌صورت ماتریکس کشت داده شدند. پلیت ماتریکس به‌منظور رشد باکتری‌ها به‌مدت 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 بررسی حضور ژن کلون شده (*tagD*) در آن از تکنیک PCR 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، 5'- GTTTTCAGGTTGTTAGCACGCTTC -3' و برای پرایمر Reverse، 5'- CCAACAGCACACCGTAATTTTCC -3' بود که سایز باند آن ۵۳۷ bp بود. لازم‌به ذکر است که بعد از انجام تکنیک PCR (Biorad ساخت کشور آلمان) تأیید پلاسمید نوترکیب به‌روش هضم آنزیمی صورت گرفت. برای تأیید حضور ژن *tagD* در پلاسمید pFLAG-CMV-3، از هضم آنزیمی دوگانه استفاده شد و آنزیم محدودالاثر BglII و EcoRV 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 زمانی‌که سلول‌ها به تراکم ۷۰٪ رسیدند از آن‌ها رسوب 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 لامل‌گذاری شمارش شد. سپس تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد و از سلول‌های گروه‌های تیمار و شاهد رسوب‌گیری صورت گرفت.

تشخیص آپوپتوز

در تحقیق حاضر برای تعیین درصد سلول‌های آپوپتوز شده از کیت انکسین V (زیست‌فرآورد ساخت کشور آلمان) برای تجزیه و تحلیل سریع مراحل مختلف آپوپتوز استفاده شد. انکسین V به فسفاتیدیل سرین (PS) متصل می شود که در قسمت داخلی غشای سیتوپلاسمی در سلول‌های سالم قرار دارد. اما پس از شروع آپوپتوز، PS به‌سرعت در قسمت بیرونی غشای سیتوپلاسمی جابه‌جا می‌شود که تصور می‌شود در تشخیص ماکروفاژ نقش مهمی را ایفا می‌کند، بنابراین سلول‌های آپوپتوز را می‌توان به‌سرعت فاگوسیتوز کرد. اتصال انکسین V به PS وابسته‌به Ca_2 است و یک بافر واکنش حاوی Ca_2 خاص در طول فرآیند اتصال مورد نیاز است. کیت تشخیص آپوپتوز MabTag شامل propidium یدید است که باعث شناسایی سلول‌ها از یکدیگر می‌شود. لازم‌به 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 آزما) صورت گرفت. هم‌چنین برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن *GAPDH* انجام شد. از طرفی جهت تعیین دمای دقیق Anneling پرایمرها ابتدا PCR با پرایمرهای مناسب انجام گرفت که توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. در نهایت محصول‌های PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. سپس با نور UV مشاهده و تصویر 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 پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام Real Time PCR (Corbett ساخت کشور استرالیا) استفاده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

جدول ۱- اطلاعات و مشخصات پرایمرها

نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول
GPR83	F: 5 ' - TTTCACTCCCA CATGCTATCTGC -3 ' R: 5 '- CAGAGATGATG AGGAGGGGCAG -3 '	64	171 bp
GAPDH	F: 5 ' - AAATCCCATCA CCATCTTCCAG -3 ' R: 5 ' - CAGAGATGA TGACCCTTTTGGC -3 '	65	183 bp

شد (۲۱). لازم‌به ذکر است که برای بررسی میزان تغییر بیان، ژن خانه‌دار *GAPDH* به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد. مواد به‌نسبت‌های ۰/۴ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت، cDNA (۲۵(ng/µL ۲ میکرولیتر، SYBR Green master mix (2X) ۷/۵ میکرولیتر و ddH2O ۴/۷ 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 سانتی‌گراد، ۲۰Denaturation ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۲۵ ثانیه و ۶۴ درجه سانتی‌گراد و Extension ۲۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد و تعداد چرخه‌های این تکنیک ۴۵ در نظر گرفته شد.

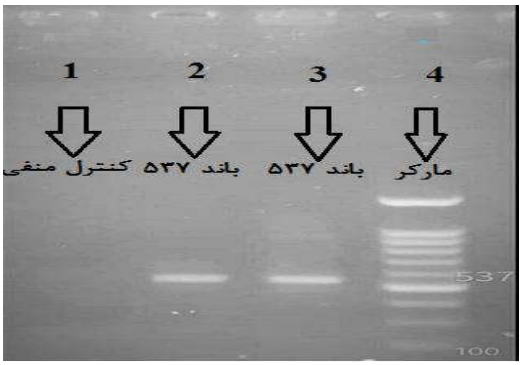
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و آزمون‌های آماری t-Indepent test بیان ژن مورد نظر بررسی و مقایسه شد که اگر p-Value ≤ ۰/۰۵ باشد، تفاوت داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب می‌گردد.

نتایج

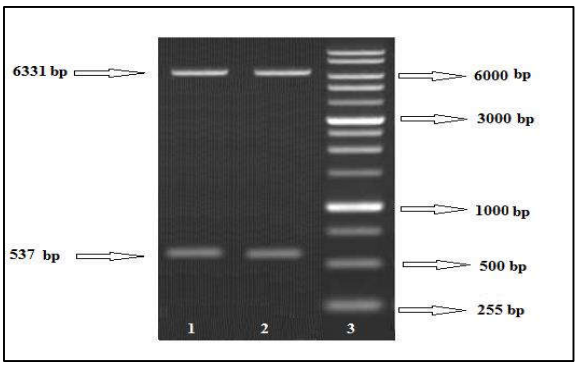
تأیید صحت پلاسمیدها به روش PCR و هضم آنزیمی

با انجام PCR به‌وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن *TagD*، باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به این ژن روی ژل آگارز دیده شد. نتیجه این آزمایش در شکل ۱ دیده می‌شود.



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 BglII و EcoRV روی پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3-*tagD* 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 آنزمی وکتور حاوی ژن *tagD*. قطعه نگین ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور و قطعه ۵۳۷جفت بازی مربوط به ژن *tagD* است که چاهک سه مارکر است و دو چاهک دیگر سایز باند مورد نظر را نشان می‌دهند.

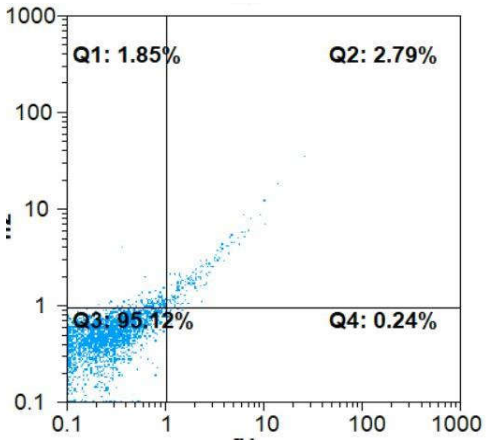
نتایج بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت انکسین

همان‌طور 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 می‌شود. PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری است. نتایج حاصل از آن در شکل‌های ۳ و ۴

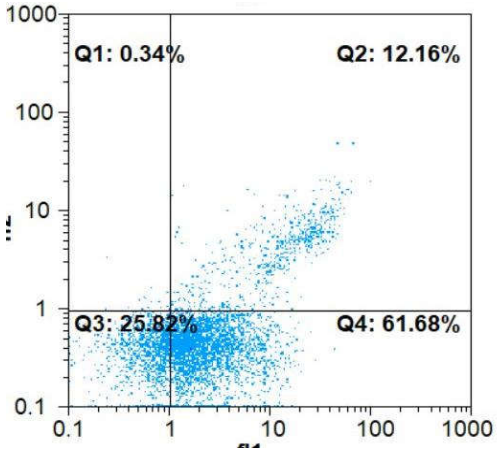
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

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. به‌علاوه درصد سلول‌های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی در ناحیه Q2 ۱۲/۱۶ درصد بود.



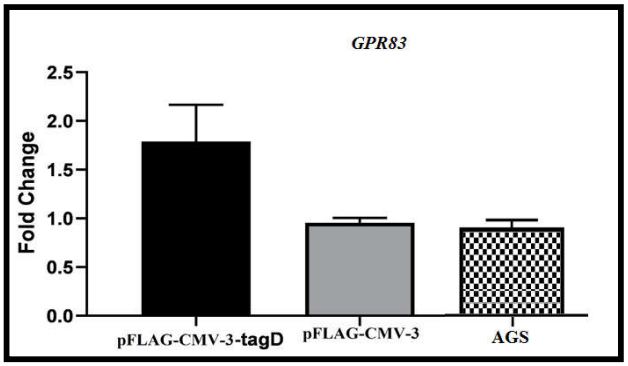
شکل ۳- نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه کنترل



شکل ۴- نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه تیمار

بررسی آماری

نتایج آنالیز آماری مربوط به ژن *GPR83* به‌وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه یا به‌عبارتی نمونه ژن موردنظر و نمونه ژن کنترل داخلی، به‌صورت جداگانه برای انجام آنالیز و به‌دست آوردن تغییر بیان یادداشت گردید که نتایج حاصل از آن در شکل ۷ آورده شده است. در این آنالیز تغییر بیان ژن *GPR83* نسبت‌به گروه PFLAG-CMV-3 و AGS افزایش داشت که این افزایش از نظر آماری معنا دار نبود.



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

بحث

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری باسیلی شکل کوچک گرم منفی با تحرک 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 *هلیکوباکترپیلوری* 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 به‌عنوان مثال در سال ۲۰۱۷، گروهی از محققان به سرپرستی Safarpour مطالعه‌هایی را روی ژن *tagD* *هلیکوباکترپیلوری* انجام دادند. این محققان ژن *tagD* *هلیکوباکترپیلوری* را که به‌طول ۵۳۷ جفت باز است را با روش واکنش PCR تکثیر نموده و محصول‌های PCR را در وکتور بیان شونده یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 کلون نمودند. 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* *هلیکوباکترپیلوری*، تغییر می‌یابد و با توجه‌به نتایج ما، به‌نظر می‌رسد، ژن *GPR83* *هلیکوباکترپیلوری* در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته‌باشد.

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

زیادی از ژن‌ها در سلول‌های سرطانی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که در ژن‌های *CA1*، *GPR83*، *VPR2*، *TNF*، *IL1B* و *IL8* افزایش بیان و در ژن‌های *WTAP*، *AWP1*، *DDB2*، *M17S2* و *ARF3* کاهش بیان دیده می‌شود (۱۹). نتایج این بررسی حاضر نیز حاکی از آن بود که در حضور *هلیکوباکترپیلوری*، سلول‌های اپی‌تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند. در سال ۲۰۰۷ Majidi و گروهی از محققانش در مورد ارتباط *هلیکوباکترپیلوری* با پیدایش سرطان سلول سنگفرشی حنجره و هیپوفارکس تحقیق کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که در افراد مبتلا به سرطان نسبت‌به افراد سالم (گروه شاهد)، عفونت هلیکوباکتر شیوع بالاتری دارد (۲۴). در تحقیق حاضر مشاهده شد در حضور *هلیکوباکترپیلوری*، سلول‌های اپی‌تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند. در سال ۲۰۰۸ گروهی از محققان به سرپرستی Matsuda تأثیر *هلیکوباکترپیلوری* بر بیان ژن-های متعددی از سلول‌های سرطانی دستگاه گوارش را در سطح mRNA بررسی نمودند که نتایج نشان داد در سلول-های MKN45 بیان ژن‌های *MUC2*، *MUC5AC* و *MUC6* افزایش یافت اما بیان ژن *CDX2* مهار شد (۲۵). نتایج این بررسی حاکی از آن بود که در حضور *هلیکوباکترپیلوری*، سلول‌های اپی‌تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند. مثلا وقتی محققان سلول‌های رده سرطان معده AGS را با *هلیکوباکترپیلوری* آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن‌های *CA1*، *GPR83*، *VPR2*، *TNF*، *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن‌های *WTAP*، *AWP1*، *DDB2*، *M17S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند.

نتیجه‌گیری

در حضور *هلیکوباکترپیلوری*، سلول های اپی‌تلیوم معده تغییر رفتار نشان می‌دهند و در بیان تعداد زیادی از ژن‌های خود، افزایش یا کاهش بیان نشان می‌دهند به‌عنوان مثال طی تحقیقی دانشمندان سلول‌های رده سرطان معده AGS را با *هلیکوباکترپیلوری* آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن‌های *CA1*، *GPR83*، *VPR2*، *TNF*، *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن‌های *WTAP*، *AWP1*، *DDB2*، *M17S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند. به‌طور کلی، نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن *GPR83* در سلول‌های تحت تیمار با ژن *tagD هلیکوباکترپیلوری*، تغییر می‌یابد و با توجه‌به نتایج ما، به‌نظر می‌رسد، ژن *GPR83 هلیکوباکترپیلوری* در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته‌باشد.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

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 Echerichia 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

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, Haghighat 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.7.4]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]