



Scan online to view this article

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

Fariba Heidari<sup>1</sup>, Abbas Doosti <sup>\*2</sup>

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](mailto:abbasdoosti@yahoo.com)



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب pFLAG-CMV-3-tagD

فریبا حیدری<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

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 هلیکوباکتری پیلوری از عوامل اصلی ایجادکننده سرطان معده در انسان است. ژن *tagD* هلیکوباکتری پیلوری که کد 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 آدنوکارسینوما معده (adenocarcinoma gastric cell line یا AGS) ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب pFLAG-CMV-3-tagD به روش Real Time PCR است.

**مواد و روش ها:** سلول های AGS به کمک محلول لیپوفکتامین و با پلاسمید حامل ژن کد کننده *tagD* هلیکوباکتری پیلوری 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* هلیکوباکتری پیلوری 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 Indepent 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* هلیکوباکتری پیلوری، تغییر می یابد و به نظر می رسد که ژن *GPR83* هلیکوباکتری پیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش دارد.

**واژه های کلیدی:** هلیکوباکتری پیلوری، *tagD*، *GPR83*، AGS، IAU science

### مقدمه

سرطان در اثر یک سری رویدادهای مولکولی و تغییرهای

#### 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

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 بدخیمی 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

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، سلول‌های اپی‌تلیوم 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 *CAI*، *GPR83*، *VPR2*، *TNF*، *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن‌های *WTAP*، *AWP1*، *DDB2* و *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 نو ترکیب 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 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

چند ویژگی از دیگر سرطان‌ها متمایز می‌گردد که مهم‌ترین آن‌ها ارتباط آن با عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. این ویژگی سرطان معده را جزء معدود سرطان‌هایی قرار می‌دهد که عامل عفونی به‌طور کامل شناخته شده دارند. علت دوم پیچیدگی علت شناسی سرطان معده، روند التهاب‌زایی عفونت باکتریایی 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 سریع‌تر 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 تاژک است و حالت باکتری می (bacteraemia) ندارد، یعنی قادر به ورود به سیستم گردش خون انسان نیست. هلیکوباکتر پیلوری دارای مشخصات نیایی به صورت، شاخه پروتئوباکتریا، رده اپسیلون پروتئوباکتریا، راسته کامپیلوباکتریا و خانواده هلیکوباکتر است (۷-۹). 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 دی‌اکسید کربن هیدرولیز می‌کند. آمونیاک از طرفی با خنثی کردن اسید معده زمینه رشد و بقا 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 هلیکوباکتر پیلوری و بیماری خود ایمنی 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 اسید آمینه است. تیول پراکسیداز یکی از آدهسین‌های 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 لامل سنگین لامل‌گذاری شد. لام زیر میکروسکوپ و با عدسی  $\times 10$  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.

### تکتیر 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 pFLAG-CMV-3 استفاده شد (۱۵). پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3 حامل ژن *tagD* باکتری هلیکوباکتریلیوری 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. تکتیر پلاسمید با انتقال آن به میزبان باکتریایی که به‌طور عمده شامل سویه‌های مناسب از باکتری *اشریشیاکلی* است، انجام شد. لازم‌به‌ذکر 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'-GTTTTTCAGGTTGTTAGCACGCTTC-3' و برای پرایمر Reverse، 5'-CCAACAGCACACCGTAATTTTCC-3' بود که سایز باند آن ۵۳۷ bp بود. لازم‌به‌ذکر 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 محدودالایر 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 زمانی که 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 می‌شود 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 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 یدید است که باعث شناسایی سلول‌ها از یکدیگر می‌شود. لازم‌به‌ذکر 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.

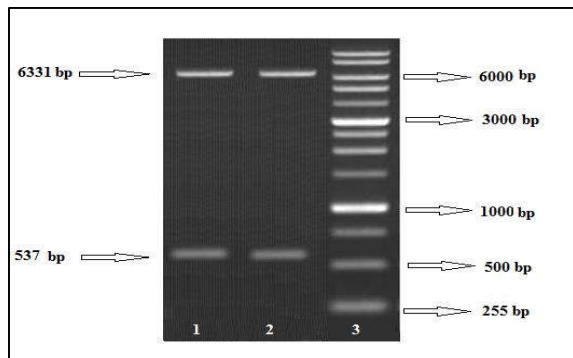
### تکنیک Real time RT-PCR

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



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 BglIII و EcoRV روی پلاسمید نو ترکیب 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 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 آنکسین

همان طور که اشاره شد در طی فرآیند آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا منتقل می شود که آنکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می شود. PI 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	دمای اتصال	اندازه محصول
<i>GPR83</i>	F: 5' - TTTCACCTCCCA CATGCTATCTGC -3' R: 5' - CAGAGATGATG AGGAGGGGCAG -3'	64	171 bp
<i>GAPDH</i>	F: 5' - AAATCCCATCA CCATCTTCCAG -3' R: 5' - CAGAGATGA TGACCCTTTTGGC -3'	65	183 bp

شد (۲۱). لازم به 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، SYBR Green master mix (۲۵ ng/μL) ۲ میکرولیتر، (2X) ۷/۵ میکرولیتر و ۴/۷ ddH<sub>2</sub>O 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 Denaturation ۳ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۰ Denaturation ۲۰ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۵ Annealing ۶۴ درجه سانتی گراد و ۲۰ Extension 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

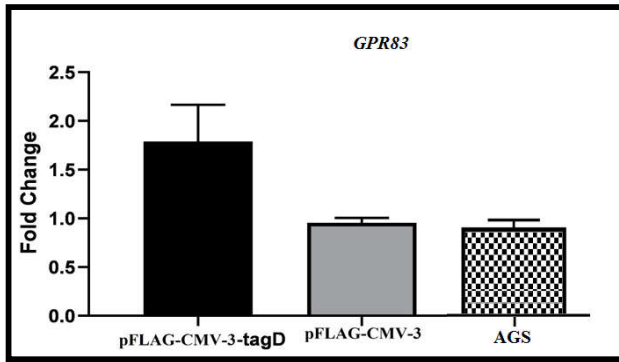
با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و آزمون های آماری t-Independent test بیان ژن مورد نظر بررسی و مقایسه شد که اگر  $p\text{-Value} \leq 0.05$  باشد، تفاوت داده ها از لحاظ آماری معنی دار محسوب می گردد.

### 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 آگارز دیده شد. نتیجه این آزمایش در شکل ۱ دیده می شود.





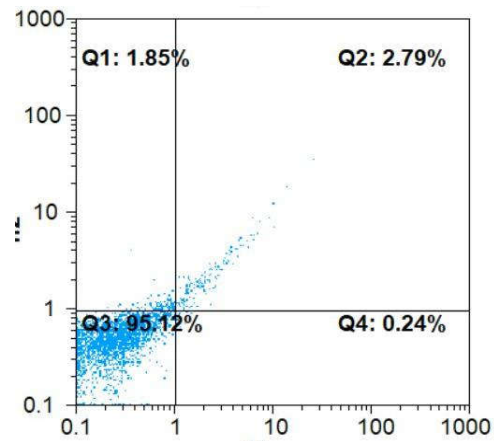
شکل ۷- آنالیز آماری بیان ژن *GPR83*. بیان ژن *GPR83* در گروه مورد آزمایش (دریافت کننده ژن *tagD*) نسبت به گروه کنترل افزای

### بحث

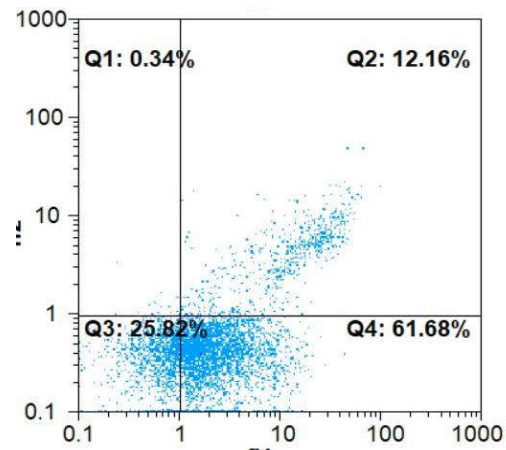
هلیکوباکتریپیلوری یک باکتری باسیلی شکل کوچک گرم منفی با تحرک بسیار زیاد است که در لایه مخاطی معده انسان، عفونت ایجاد می‌نماید. عفونت این باکتری می‌تواند در کودکی ایجاد شود اما میزان شیوع آن با افزایش سن رابطه مستقیم دارد و بیش‌تر موارد آن بدون علامت است لیکن در صورت ادامه روند عفونت، ۱۰ تا ۱۵ درصد افراد دچار زخم معده یا سرطان معده خواهند شد (۲۲،۲۳). در حضور هلیکوباکتریپیلوری 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* هلیکوباکتریپیلوری انجام دادند. این محققان ژن *tagD* هلیکوباکتریپیلوری را که به طول 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 نو ترکیب 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* هلیکوباکتریپیلوری، تغییر می‌یابد و با توجه به نتایج ما، به نظر می‌رسد، ژن *GPR83* هلیکوباکتریپیلوری 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

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 آپپتوز شده جوان در ناحیه Q4 یعنی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپپتوز به ۶۱/۶۸ درصد رسیده است. به‌علاوه درصد سلول‌های آپپتوز شده دیررس یا نکروزی در ناحیه Q2 ۱۲/۱۶ درصد بود.



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



شکل ۴- نتایج بررسی آپپتوز 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 به عبارتی نمونه ژن مورد نظر 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* نسبت به گروه PFLAG-CMV-3 و AGS 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* هلیکوباکتریپیلوری، تغییر می یابد و با توجه به نتایج ما، به نظر می رسد، ژن *GPR83* هلیکوباکتریپیلوری 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.

زیادی از ژن ها در سلول های سرطانی تحت تأثیر قرار می گیرد. به طوری که در ژن های *IL1B*, *TNF*, *VPR2*, *GPR83*, *CA1* و *IL8* افزایش بیان و در ژن های *DDB2*, *AWP1*, *WTAP* و *MI7S2* و *ARF3* کاهش بیان دیده می شود (۱۹). نتایج این بررسی حاضر نیز حاکی از آن بود که در حضور هلیکوباکتریپیلوری، سلول های اپی تلیوم 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 هلیکوباکتریپیلوری 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 هلیکوباکتریپیلوری، سلول های اپی تلیوم 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 هلیکوباکتریپیلوری 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 *MUC6* افزایش یافت اما بیان ژن *CDX2* مهار شد (۲۵). نتایج این بررسی حاکی از آن بود که در حضور هلیکوباکتریپیلوری، سلول های اپی تلیوم 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 هلیکوباکتریپیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن های *CA1*, *GPR83*, *VPR2*, *TNF* و *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن های *WTAP*, *AWP1*, *DDB2*, *MI7S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند.

## نتیجه گیری

در حضور هلیکوباکتریپیلوری، سلول های اپی تلیوم 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 هلیکوباکتریپیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن های *CA1*, *GPR83*, *VPR2*, *TNF* و *IL1B* و *IL8* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژن های *WTAP*, *AWP1*, *DDB2* و *MI7S2* و *ARF3* کاهش بیان دارند. به طور کلی، نتایج حاصل از تحقیق

- 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CD25<sup>–</sup> T cells leads to the induction of Foxp3<sup>+</sup> 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;22:1415.
- 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.

