



## بررسی بیان ژن VPR2 در سلولهای AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن tagD هلیکوباتر پیلوئی

شهرزاد افشاریپور: کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

عباس دوستی: دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (\* نویسنده مسئول) [abbasdoosti@yahoo.com](mailto:abbasdoosti@yahoo.com)

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

باکتری هلیکوباتر پیلوئی، tagD، VPR2

**زمینه و هدف:** هلیکوباتر پیلوئی با پیشرفت سرطان معده ارتباط دارد. آنژیم تیول پروکسیداز که در این باکتری توسط ژن tagD رمزگذاری می‌شود، نقش مهمی را در اتصال باکتری و کلونیزاسیون آن در معده انسان بازی می‌کند. هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن VPR2 در سلول‌های AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن tagD هلیکوباتر پیلوئی است.

**روش کار:** در این پژوهش، سلول‌های AGS در محیط ۱۶۴۰-RPMI دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی و در شرایط استاندارد کشت داده شدند. این سلول‌ها با وکتور نوترکیب PFLAG-CMV-3-tagD یا وکتور خالی PFLAG-CMV-3 به عنوان کنترل، ترانسفکت شدند. RNA کامل سلول استخراج شد و سنتز cDNA صورت پذیرفت. سپس با روش real time RT-PCR میزان بیان ژن VPR2 در هر دو گروه سلول‌های AGS ترانسفکت شده تست و کنترل، بررسی شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری t-test Independent t-test نتایج مقایسه شد.

**یافته‌ها:** بیان یوکاربیوتی ژن tagD در سلول‌های AGS دریافت کننده ژن tagD با انجام آزمایش RT-PCR تایید شد. بیان ژنهای VPR2 در سلول‌های AGS دریافت کننده ژن tagD نسبت به سلول‌های کنترل به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد ( $p=0.0203$ ).

**نتیجه‌گیری:** براساس یافته‌های حاصل، می‌توان نتیجه گرفت که ژن tagD هلیکوباتر پیلوئی، با اثر بر سلول‌های AGS، می‌تواند سبب کاهش یا افزایش بیان در این سلول‌ها گردد. ژن tagD یکی از ژن‌های مهم هلیکوباتر پیلوئی است که می‌تواند بر روی سلول‌های میزبان تأثیر بگذارد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** دانشگاه آزاد شهرکرد

#### شیوه استناد به این مقاله:

Afsharipoor Sh, Doosti A. Investigation of VPR2 gene expression in AGS cells transfected with recombinant vector carrier of tagD gene of Helicobacter pyloriExpression of VPR2 Gene in AGS. Razi J Med Sci. 2020;27(7):40-49.

\* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Investigation of VPR2 gene expression in AGS cells transfected with recombinant vector carrier of tagD gene of Helicobacter pyloriExpression of VPR2 Gene in AGS

**Shahrzad Afsharipoor**, MA, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

**Abbas Doosti**, Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (\*Corresponding author) abbasdoosti@yahoo.com

### Abstract

**Background:** Cancer is the first and second leading cause of death in developed and developing countries and gastric cancer is one of the most common and dangerous types of cancer in Iran, where 10,000 people are infected with this disease every year and it is the most common type. Cancer is also among men. The Ministry of Health has announced that Iran has the most stomach cancer in the world. The main etiology for gastric cancer is *Helicobacter pylori* infection. Many studies have shown that most people with gastric cancer have a previous history of *Helicobacter pylori* infection, while less than one in 100 people with *Helicobacter pylori* infection are at risk for gastric cancer. Take; Therefore, *Helicobacter pylori* infection is an important factor in the development of gastric cancer, but there must be many environmental and possibly genetic factors in order to lead to gastric cancer. *Helicobacter pylori* is a small, highly motile gram-negative rod-shaped bacterium that infects the mucous membrane of the human stomach. Infection of this bacterium can occur in childhood, but its prevalence is directly related to aging and most cases are asymptomatic, but if the infection continues, 10 to 15% of people will develop gastric ulcer or gastric cancer. The thiol peroxidase-binding tagD gene in *Helicobacter pylori* is one of the most important adhesion molecules in *H. pylori*, which encodes triglyceride Citidyltransferase. HpTpx protein is an antioxidant protein that plays an important role in empowering *Helicobacter pylori* to survive in gastric oxidative stress. HpTpr is present in the form of a hydrodynamic monomer and is an enzyme whose peroxidase and antioxidant activities are fully preserved. *H. pylori* produces a set of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase, and peroxidase, to survive in the gastric environment, which can reverse the ROS reaction. Reduction of TagD protein leads to gradual transition from cell cycle stage to cell lysis and also causes bacterial deformation from bacillus to spherical state, irregular bacterial growth, swollen spherical shapes, unequal distribution in receptors, peptidoglycan thickening and cell lysis. Gene 2 VPR2 (Vasopressin receptor type) is located in the Xq28 position in humans and consists of 5 exons. This hormone has a peptide structure and is released from the pituitary gland. Lack of secretion of this hormone from the pituitary gland causes neurogenic type 2 diabetes and its lack of effect on the kidney causes nephrogenic type 2 diabetes. VPR2 gene expression has been shown in fetal lung tissue and lung cancer. Therefore, in the present study, our aim was to investigate the expression of VPR2 gene in AGS cells transfected with the recombinant vector carrying the tagD gene of *Helicobacter pylori*.

### Keywords

*Helicobacter pylori*, tagD, VPR2

Received: 24/06/2020

Published: 26/09/2020

**Methods:** The present study was performed at the Biotechnology Research Center of Islamic Azad University of Shahrekord. The duration of the research lasted from January 2016 to June 2017. Gastric cancer cells, AGS class, were obtained from the Biotechnology Research Center of Shahrekord Branch of Azad University. The recombinant plasmid was then confirmed by enzymatic digestion. To confirm the presence of tagD gene in plasmid 3-pFLAG-CMV, dual enzymatic digestion was used and BglIII and EcoRV restriction enzymes were used. AGS cells were cultured in a T25 flask. When the cells reached a density of 70%, cell pellets were prepared and cell suspension per ml was prepared from the culture medium. 10 µl of the suspension along with 10 µl of trypan blue dye was placed on the neobar beam and counted after lamination and then the number of cells in 1 ml of culture medium was calculated and finally the cells of the treatment and control groups were precipitated. In the present study, Anxin V kit was used to determine the percentage of apoptotic cells for rapid analysis of different stages of apoptosis. To prove the correctness of the synthesized cDNA, PCR was performed with GAPDH gene primers. Then, to determine the exact temperature of annealing primers, PCR was performed with appropriate primers. Using SPSS software and t-test Independent statistical tests, the expression of each gene was examined and compared. If  $p > 0.05$  is, the difference in data is statistically significant.

**Results:** Eukaryotic expression of tagD gene in AGS cells of tagD gene was confirmed by RT-PCR. Expression of VPR2 genes in AGS cells receiving tagD gene was significantly higher than control cells ( $p = 0.0203$ ).

**Conclusion:** The findings of the present study indicate the effects of decreasing or increasing expression in some cell genes under the influence of the tagD gene of Helicobacter pylori. Because the tagD gene is one of the most important genes in Helicobacter pylori, it plays a vital role in its colonization in the human stomach. Therefore, this gene may be involved in cell proliferation. Overall, the results of our study showed that VPR2 gene expression can be affected by Helicobacter pylori tagD gene, and it appears that this bacterium alters tagD gene expression in host cells.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Islamic azad University Branch Shahrekord

**Cite this article as:**

Afsharipoor Sh, Doosti A. Investigation of VPR2 gene expression in AGS cells transfected with recombinant vector carrier of tagD gene of Helicobacter pyloriExpression of VPR2 Gene in AGS. Razi J Med Sci. 2020;27(7):40-49.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

تولید کرده که می‌توانند واکنش ROS را حذف نموده و آن را از بین ببرند (۱۰، ۱۱). کاهش پروتئین *TagD* به انتقال تدریجی از مرحله چرخه سلولی به لیز سلولی میانجامد و همچنین سبب تغییر شکل باکتری از حالت باسیلی به کروی، بزرگ شدن نامنظم باکتری، ایجاد اشکال کروی متورم، تقسیم نابرابر در رسپتورها، ضخیم شدن پیتیدوگلیکان و لیز سلولی می‌گردد (۱۱).

ژن *VPR2* (vasopressin receptor, type 2) در انسان در موقعیت Xq28 قرار دارد و از ۵ اگزون تشکیل شده است. این هورمون ساختار پیتیدی داشته و از نوروهیپوفیز آزاد می‌شود و عدم ترشح این هورمون از غده هیپوفیز موجب بروز بیماری دیابت بی‌مزه نوع نوروزنیک و عدم تأثیر آن بر کلیه موجب بروز بیماری دیابت بی‌مزه نوع نوروزنیک می‌شود. بیان ژن *VPR2* در بافت ریه جنین و سرطان ریه نشان داده شده است. بنابراین در مطالعه حاضر هدف ما بررسی بیان ژن *VPR2* در سلولهای AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب حامل ژن *tagD* هلیکوباکتر پیلوری است (۱۲-۱۴).

## روش کار

رده سلول‌های مورد استفاده و کشت آنها: تحقیق حاضر در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد. مدت زمان اجرای تحقیق از دی ماه ۱۳۹۷ تا خرداد ماه ۱۳۹۸ به طول انجامید. سلول‌های سرطانی معده، رده AGS از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد گرفته شد. ابتدا محیط کشت پایه RPMI ۱۶۴۰ به محیط کشت کامل تبدیل شد. 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.

پلاسمیدها pFLAG-CMV-3-*tagD* و تکثیر: پلاسمید نوترکیب ۳-pFLAG-CMV-*tagD* حامل ژن *tagD* باکتری هلیکوباکتر پیلوری و همچنین پلاسمید ۳-pFLAG-CMV بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، تهیه شد. تکثیر پلاسمید با انتقال آن به میزبان باکتریایی که عمدها شامل سویبهای مناسب از باکتری اشريشیاکلی

## مقدمه

سرطان در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ است (۱) و سرطان معده از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین انواع سرطان در کشور ایران است که هرسال ۱۰ هزار نفر در کشور مبتلا به این بیماری می‌شوند و شایع‌ترین نوع سرطان هم در بین مردان است وزارت بهداشت اعلام کرده است که ایران بیشترین بیماری سرطان معده را در جهان دارد. اصلی‌ترین اتیولوژی برای سرطان معده، عفونت با هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. تحقیقات بسیاری نشان داده است که اغلب افراد مبتلا به سرطان معده، سابقه قبلی ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری را داشته‌اند و این در حالی است که از هر ۱۰۰ نفر مبتلا به عفونت با هلیکوباکتر، کمتر از یک نفر در معرض ابتلا به سرطان معده قرار می‌گیرد؛ بنابراین عفونت با هلیکوباکترپیلوری یک امر مهم برای به وجود آمدن سرطان معده است اما عوامل بسیار محیطی و احتمالاً ژنتیکی نیز باید وجود داشته باشد تا بتواند منجر به سرطان معده شود (۲-۴). هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) یک باکتری میله‌ای شکل کوچک گرم منفی با تحرک بسیار زیاد است که در لایه مخاطی معده انسان، ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت این باکتری می‌تواند در کودکی ایجاد شود اما میزان شیوع آن با افزایش سن رابطه مستقیم داشته و اغلب موارد آن بدون علامت است اما در صورت ادامه روند عفونت، ۱۰ تا ۱۵ درصد افراد دچار زخم معده یا سرطان معده خواهند شد (۵-۷).

ژن *tagD* متصل شونده تیول پر اکسیداز در هلیکوباکتر پیلوری یکی از مهم ترین مولکولهای چسبان در هلیکوباکتر پیلوری، که تری گلیسرول سیتیدیلیل ترانسفراز را رمز گذاری می‌کند. پروتئین *HpTpx* یک پروتئین آنتی اکسیدان بوده که در توانمندسازی هلیکوباکتر پیلوری به منظور ادامه حیات در فشار و استرس اکسیداتیو معده نقش مهمی ایفا می‌کند (۸). *HpTpx* به شکل مونومر هیدرودینامیک وجود دارد و آنزیمی است که قعالیت های پر اکسیداز و آنتی اکسیدان آن کاملاً حفظ شده است. هلیکوباکتر پیلوری برای زنده ماندن در محیط معده مجموعه‌ای از آنزیمهای آنتیاکسیدان از جمله سوپر پراکسید دیسموتازها (SOD)، کاتالازها و پراکسی ریدوکسین را

تشخیص آپوپتوز: در پژوهش حاضر برای تعیین درصد سلولهای آپوپتوز شده از کیت انکسین ۷ برای تجزیه و تحلیل سریع مراحل مختلف آپوپتوز استفاده شد. انکسین ۷ به فسفاتیدیلسیرین (PS) متصل می‌شود که در قسمت داخلی غشای سیتوپلاسمی در سلول‌های سالم قرار دارد. اما پس از شروع آپوپتوز، PS به سرعت در قسمت بیرونی غشای سیتوپلاسمی جابجا می‌شود که تصور می‌شود در تشخیص ماکروفاز نقش مهمی را ایفا می‌کند، بنابراین سلول‌های آپوپتوز را می‌توان به سرعت فاگوسیتوز کرد. اتصال انکسین ۷ به PS وابسته به  $2\text{Ca}^{2+}$  است و بنابراین یک بافر واکنش حاوی  $2\text{Ca}^{2+}$  خاص در طول فرآیند اتصال مورد نیاز است. کیت تشخیص آپوپتوز MabTag حاوی به نام propidium Yiddid (PI) است که باعث شناسایی سلولها از یکدیگر می‌شود. در مرحله بعد برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus شرکت سیناکلون استفاده شد و روش cDNA و سنتز cDNA treatment tagD در این مرحله در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش PCR: برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن *GAPDH* انجام شد. سپس جهت تعیین دمای دقیق Anneling پرایمرهای ابتدا PCR با پرایمرهای مناسب انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ آمده است. در نهایت محصولات PCR روی ژل آگاراز ۱٪ الکتروفورز شدند. سپس با نور UV مشاهده و تصویر تهیه شد.

برای بررسی میزان تغییر بیان Real time RT-PCR در ژن‌های مورد مطالعه، در سلول‌های ردهی سلولی AGS در دو سلول ترانسفکت شده و کنترل، از جفت پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام real time RT-PCR استفاده شد. همچنین از پرایمرهایی برای بررسی میزان تغییر بیان ژن خانه‌دار *GAPDH* به

جدول ۱ - توالی‌های پرایمر مورد استفاده در این تحقیق			
	توالی پرایمر	سایز باند (bp)	پرایمر
Forward	5'-AGCGTCGACATTAGA AAGGATTAAACCATGC-3'	537	
Reverse	5'-TCCGAGTACTAACTT CCTATTCCAACAC-3'		

است، انجام می‌شود. جهت انجام ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* با پلاسمید، در سلول مستعد ساخته شد و پس از رشد کلینیهای باکتریایی، تعداد ۱۰ عدد از آنها به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شده و روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک، به صورت ماتریکس کشت داده شدند. پلیت ماتریکس نیز به منظور رشد باکتریها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Favorgene انجام شد و در نهایت با استفاده از تکنیک PCR تایید شد که پرایمرهای اختصاصی tagD در این مرحله در جدول ۱ آورده شده است.

سپس تایید پلاسمید نوترکیب به روش هضم آنزیمی صورت گرفت که برای تایید حضور ژن tagD در پلاسمید pFLAG-CMV ۳-، از هضم آنزیمی دوگانه استفاده شد و آنزیم محدودالاثر *Bgl*III و *Eco*RV مورد استفاده قرار گرفت.

روش انتقال پلاسمید به سلول (لیپوفکشن): سلولهای AGS درون فلاسک ۲۵T کشت داده شدند، زمانی که سلولها به تراکم ۷۰٪ رسیدند از آن‌ها رسوب سلولی تهیه شد و سوسپانسیونسلولی در ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون همراه با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو روی لام نئوبار قرار گرفت و پس از لامل گذاری شمارش شد و سپس تعداد سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد و در نهایت از سلول‌های گروههای تیمار و شاهد، رسوبگیری انجام شد.

جدول ۲ - اطلاعات و مشخصات پرایمرهای

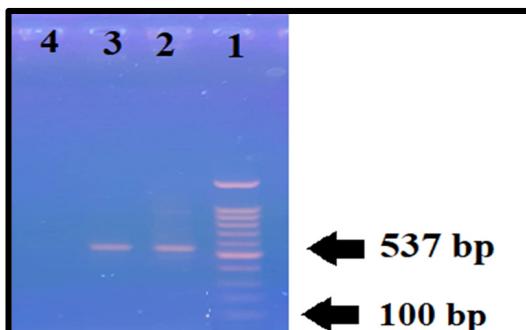
نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای اتصال (°C)
VPR2	F: 5'-TGGATTGCCCTGATGGTGTTC-3' R: 5' CAGCACATAGACGACCACAATCAC-3'	64	225
GAPDH	F: 5'-AAATCCCATCACCATTTCCAG-3' R: 5'-CAGAGATGATGACCCTTTGGC-3'	63	183

ژل آگارز دیده شد. نتیجه این آزمایش در شکل ۲ دیده می‌شود.

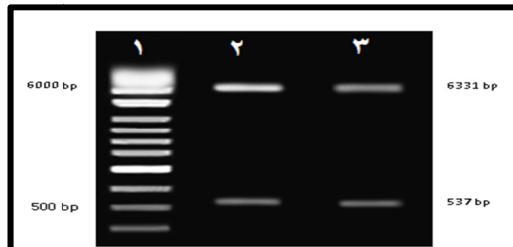
انجام برش آنزیمی با دو آنزیم *EcoRV* و *BglII* روی پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3-*tagD* سبب تشکیل دو باند ۶۳۳۱ و ۵۳۷ جفت بازی مربوط به پلاسمید و باند ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از ترانسفکت پلاسمید به سلول‌های AGS: بعد از ترانسفکت و انتقال پلاسمید به سلول‌های AGS، جهت غربالگری سلولهایی که پلاسمید را دریافت نموده بودند، آنتی‌بیوتیک نئومایسین افزوده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. به دلیل اینکه پلاسمید ژن مقاومت به نئومایسین را دارد بود، سلولهایی که پلاسمید دریافت کرده بودند، توانایی رشد و تکثیر داشتند. پس از گذشت ۲ هفته از کشت سلول‌ها در مجاورت نئومایسین، سلولهای پایدار دریافت کننده پلاسمید بدست آمدند که در شکل ۴ نشان داده شده است.

نتایج بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت انکسین:



**شکل ۲-** نتایج PCR بر روی پلاسمید استخراج شده که حضور باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *tagD* صحت استخراج پلاسمید را تایید کرد. چاک شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاک شماره ۴ کنترل منفی می‌باشد.



**شکل ۳-** هضم آنزیمی و کنترول حاوی ژن *tagD*. قطعه نگین ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور و قطعه ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن *tagD* است. چاک ۱: مارکر و چاک ۲ و ۳ قطعات حاصل از برش آنزیمی.

عنوان ژن رفرنس استفاده شد. مواد به نسبت‌های ۰/۴ میکرولیتر پرایمر پیشرو و پیرو، (25 ng/ $\mu$ L) (cDNA) ۲/۵ (SYBR Green master mix) (2X) ۷/۵ میکرولیتر و ۴/۷ ddH<sub>2</sub>O ۴ مخلوط گردید و سپس درون دستگاه قرار داده شد. همچنین برنامه دمایی و زمانی برای این تکنیک به این صورت بود که برای Primary Denaturation ۳ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۰ Denaturation ۹۵ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۲۵ Annealing ۶۵ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی گراد و ۲۰ Extension ۷۲ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تعداد چرخه‌های این تکنیک ۴۵ در نظر گرفته شد و در نهایت داده‌ها تجزیه و تحلیل شد

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده نمودن از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری t-test Independent بیان هر یک از ژنها بررسی و مقایسه شد. اگر  $p \leq 0.05$  باشد، تفاوت داده‌ها از لحاظ آماری معنی دار محسوب می‌گردد.

### یافته‌ها

نتایج کشت و شمارش سلولها: سلولهای AGS از فریز ۷۰ درجه سانتی‌گراد خارج شده و پس از د弗یز کردن آنها، کشت و پاساز انجام شد. بعد از اینکه کف فلاسک کاملاً پر شد، سلولها تریپسینه شدند و تعداد ۳۰۰ هزار سلول شمارش شد و در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند.

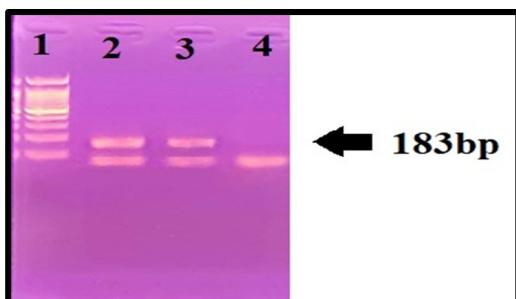
تصویر سلولهای AGS در شکل ۱ مشاهده می‌شود. تایید صحت پلاسمیدها به روش PCR و هضم آنزیمی: با انجام PCR بوسیله پرایمرهای اختصاصی ژن *tagD*، باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به این ژن روی



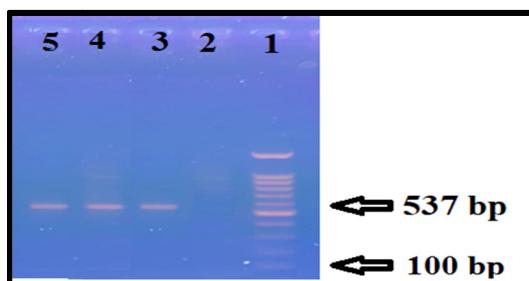
**شکل ۱-** تصویر میکروسکوپی سلول‌های AGS (بزرگنمایی  $\times 100$ )

می‌شود درصد سلول‌های زنده در ناحیه Q ۹۵ درصد بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد. در شکل ۶ درصد سلول‌های آپاپتوز شده جوان در ناحیه ۴Q ۴۰ یعنی سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپاپتوز به ۶۱/۶۸ درصد رسیده است. درصد سلول‌های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی در ناحیه ۱۲/۱۶ ۲Q ۲۰ درصد بود.

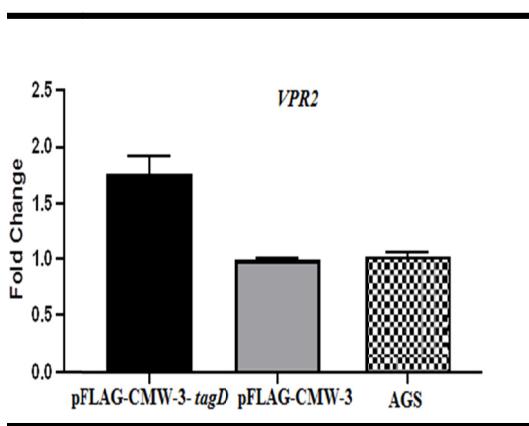
نتایج بررسی کیفی و کمی خلوص RNA استخراج شده: برای تعیین مقدار RNA مورد نظر از دستگاه



شکل ۷- بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ و ۳ باند ۱۸۳ چفت بازی مربوط به ژن *GAPDH* و چاهک ۴ کنترل منفی (فاقد DNA الگو).



شکل ۸- بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک‌های ۳ تا ۵ باند ۵۳۷ چفت بازی مربوط به ژن *tagD*

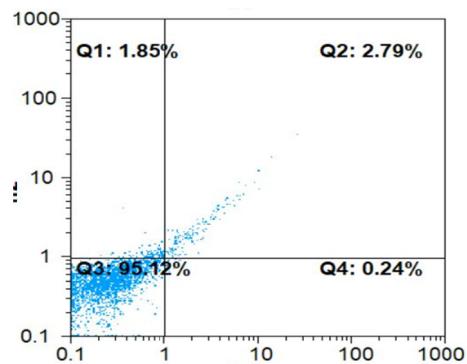


شکل ۹- آنالیز آماری بیان ژن *VPR2*

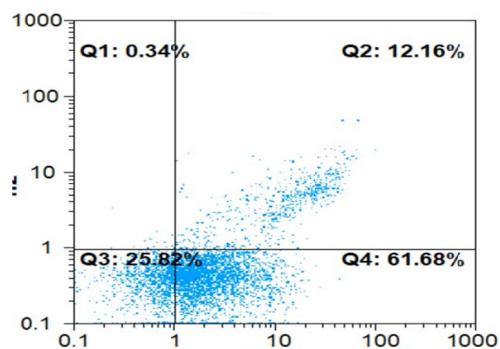
همانطور که ذکر شد در طی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا منتقل می‌شود که انکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. به علاوه PI نیز به DNA قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری می‌باشد که در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۵ مشاهده



شکل ۴- تصویر میکروسکوپی سلولهای ترانسfect شده با پلاسمید. سلولهایی که پلاسمید را دریافت کرده اند در مقابل آنتی بیوتیک نئومایسین مقاومت نشان داده و زنده مانده‌اند. سلولهایی که پلاسمید دریافت نکرده اند به صورت گرد و غیر چسبنده در شکل دیده می‌شوند. (بزرگنمایی  $\times 100$ ).



شکل ۵- نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه کنترل



شکل ۶- نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه تیمار

حضور هلیکوباکتر پیلوری، سلول‌های اپیتلیوم معده تغییر رفتار نشان میدهد و در بیان تعداد زیادی از ژنهای خود، افزایش یا کاهش بیان نشان میدهد. محققان سلول‌های رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکتر پیلوری آلوده نمودند، و متوجه شدند که ژنهای *CA1*, *IL1B*, *TNF*, *VPR2*, *GPR83*, *AWP1* و *M17S2* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژنهای *WTAP*, *DDB2*, *ARF3* و *M17S2* کاهش بیان دارند همچنین بر طبق تحقیق ما بیان ژن *VPR2* در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش بیان نشان داد. در این راستا مطالعاتی صورت گرفته است به عنوان مثال Olczak و همکاران در سال ۲۰۰۳، به بررسی محصولات ژن *tagD* پرداختند و این محققان نشان دادند که محصول ژن *tagD* به کلونیزاسیون و بقای باکتری هلیکوباکتر پیلوری در معده کمک شایانی می‌کند (۱۶). در سال ۲۰۱۶ Sulzbach و همکاران اثرات باکتری هلیکوباکتر پیلوری *VPR2* در mRNA ژنهای *NFKBI*, *P38a* و *TNF-a* در بیماران مبتلا بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها حاکی از افزایش میزان بیان ژن *TNF-a* در اینگونه بیماران بود. هر چند بیان ژنهای *NFKBI* و *P38a* در بیماران رد مقایسه با افراد سالم تغییرات بیان محوسی را نشان نداد (۱۷). Kim و همکاران در سال ۲۰۰۷ سلولهای رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکتر پیلوری آلوده نمودند و دریافتند که ژنهای *VPR2*, *GPR83*, *CA1*, *IL1B*, *TNF* و *AWP1* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژنهای *ARF3*, *M17S2*, *DDB2*, *WTAP* و *IL1B* کاهش بیان دارند و بر طبق تحقیق ما بیان ژن *VPR2* در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش بیان نشان داد (۱۸). در سال ۲۰۱۰ Yoo و همکاران نیز رده سرطان معده AGS را با هلیکوباکتر پیلوری آلوده نمودند، متوجه شدند که ژن *VPR2* افزایش بیان دارند و از طرف دیگر ژنهای *ARF3*, *M17S2*, *DDB2*, *WTAP* و *AWP1* کاهش بیان دارند که بر طبق تحقیق ما بیان ژن *VPR2* در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش بیان نشان داد (۱۹).

Matter و همکاران در سال ۲۰۱۰ رابطه‌ی ژنهای *tnpA* و *LEC* هلیکوباکتر پیلوری را با سرطان معده در

نانودرایپ استفاده شد و میزان غلظت RNA و نیز نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت که در مورد اکثر نمونه‌های مورد بررسی در محدوده طبیعی ۱/۸-۲ (۱/۸) قرار داشت. نسبت بالاتر از ۲ و پایین‌تر از ۱/۸ به ترتیب نشانه آلدگی یا DNA و پروتئین می‌باشد. همچنین صحت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز بررسی شد.

نتیجه تایید سنتز cDNA به روش PCR: از ژن *GAPDH* در تمام شرایط و در تمام سلولها، رونویسی می‌شود و آن در دسترس است. به منظور تایید صحت سنتز cDNA، با پرایمرهای اختصاصی این ژن، واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفوروز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به *GAPDH* و باند ۵۳۷ جفت بازی برای ژن *tagD* دیده شد که موید سنتز مناسب cDNA است و در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است..

نتایج آنالیز آماری مربوط به ژن *VPR2* به وسیله نرمافزار SPSS انجام شد و نتایج نشان داد که بیان ژن *pFLAG-VPR2* در گروه آزمایش نسبت به گروه *pFLAG-3-CMV* و *AGS* افزایش نشان داد که این افزایش بیان معنی‌دار بود که در شکل ۹ نشان داده شده است (p=۰.۰۲۰۳).

## بحث

با وجود تحقیقات زیاد در رابطه با اتیولوژی سرطان معده هنوز مکانیسم‌های اساسی که سبب بروز سرطان معده می‌شود، "عدم تنازن" ناشناخته باقی مانده است. سرطان معده یک بیماری چند عاملی است که فاکتورهای مختلف محیطی و ژنتیکی میزبان در بروز آن دخیل است. اکنون به خوبی مشخص شده است که سرطان معده و تغییرات قبل از سرطانی شدن به طور بسیار زیادی تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی میزبان است (۱۵). هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن *tagD* هلیکوباکتر پیلوری بر بیان ژن *VPR2* در سلولهای *AGS* ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب *pFLAG-CMV-3-tagD* به روش Real time RT-PCR طبق تحقیقات انجام شده در زمینه کشت هم زمان هلیکوباکتر پیلوری و سلول AGS نشان داده شده است که این هم کشتی روی بیان ژن *VPR2* اثر می‌گذارد. در

## References

- Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. *Arch Iran Med.* 2009;12(6):576-583.
- Okuda M, Lin Y, Kikuchi S. Helicobacter pylori Infection in Children and Adolescents. *Helicobacter pylori Hum Dis.* 2019;11(2):107-120.
- Nouraei M, Latifi-Navid S, Rezvan H, Radmard AR, Maghsudlu M, Zaer-Rezaii H, et al. Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of Helicobacter pylori infection in Iran. *Helicobacter.* 2009;14(1):40-6.
- Mourad-Baars P, Hussey S, Jones NL. Helicobacter pylori infection and childhood. *Helicobacter.* 2010;15:53-9.
- Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. *Gut.* 2015;64(9):1353-67.
- 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.
- Beydoun MA, Beydoun HA, Elbejjani M, Dore GA, Zonderman AB. Helicobacter pylori seropositivity and its association with incident all-cause and Alzheimer's disease dementia in large national surveys. *Alzheimers Dement.* 2018;14(9):1148-58.
- Paul NK, Baksh KA, Arias JF, Zamble DB. The impact of a His-tag on DNA binding by RNA polymerase alpha-C-terminal domain from Helicobacter pylori. *Protein Expr Purif.* 2019;105:541.
- Hage N, Renshaw JG, Winkler GS, Gellert P, Stolnik S, Falcone FH. Improved expression and purification of the Helicobacter pylori adhesin BabA through the incorporation of a hexa-lysine tag. *Protein Expr Purif.* 2015;106:25-30.
- 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. *J Jahrom Univ Medl Sci.* 2016;14(4).
- Austin CM, Wang G, Maier RJ. Aconitase functions as a pleiotropic posttranscriptional regulator in Helicobacter pylori. *J Bacteriol.* 2015;197(19):3076-86.
- Chen CH, Chen WY, Liu HL, Liu TT, Tsou AP, Lin CY, et al. Identification of mutations in the arginine vasopressin receptor 2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus in Chinese patients. *J Hum Genet.* 2002;47(2):66.
- Ciolek J, Reinfrank H, Quinton L, Viengchareun S, Stura EA, Vera L, et al. Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(27):7154-9.

یک جمعیت بزرگی مورد بررسی قرار دادند و اظهار cagPAI، LEC و tnp داشتند که ژنهای tagD، LEC و tnp همیکوباکتر پیلوئی با سرطان معده مرتبط بود (۲۰).

## نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان دهنده اثرات کاهش یا افزایش بیان در برخی از ژنهای سلول تحت تاثیر ژن tagD همیکوباکتر پیلوئی است. با توجه به اینکه ژن tagD یکی از ژنهای مهم همیکوباکتر پیلوئی است، نقش حیاتی در کلونیزاسیون آن در معده انسان بازی میکند. بنابراین ممکن است این ژن در تکثیر سلولی نقش داشته باشد. به طور کلی نتایج تحقیق ما نشان داد که بیان ژن VPR2 میتواند تحت تاثیر ژن tagD همیکوباکتر پیلوئی قرار گیرند و به نظر میرسد، این باکتری بیان ژن tagD را در سلول میزان را تغییر می‌دهد.

## پیشنهادات و محدودیت‌های تحقیق

یکی از محدودیت‌های این تحقیق هزینه‌های بیشتر آن بر روی رده‌های دیگر سلولهای سرطانی بود که پیشنهاد می‌شود که اثرات وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3- tagD بر روی رده‌های سلولی دیگر سرطان معده و دیگر سلولهای سرطانی با منشأهای مختلف نیز بررسی شود. پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده تأثیر وکتور نوترکیب بر میزان بیان دیگر ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی و دیگر مسیرهای سیگنالینگ سلولی نیز بررسی گردد و همچنین پیشنهاد می‌شود که تأثیر وکتور نوترکیب حاوی ژن tagD بر میزان بیان سیتوکین‌ها و دیگر نشانگرهای توموری مهم در سرطان در حیوان آزمایشگاهی نیز بررسی گردد.

## تقدیر و تشکر

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می‌باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

14. Tiulpakov A, White CW, Abhayawardana RS, See HB, Chan AS, Seeber RM, et al. Mutations of vasopressin receptor 2 including novel L312S have differential effects on trafficking. *Mol Endocrinol*. 2016;30(8):889-904.

15. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006;12(19):2979.

16. Olczak AA, Seyler Jr RW, Olson JW, Maier RJ. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun*. 2003;71(1):580-3.

17. Sulzbach De Oliveira H, Biolchi V, Richardt Medeiros H, Bizerra Gandor Jantsch D, Knabben De Oliveira Becker Delving L, Reckziegel R, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on NFKB1, p38 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression levels in human gastric mucosa. *Exp Ther Med*. 2016;11(6):2365-72.

18. 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 Liver*. 2007;1(1):40.

19. Yoo EJ, Park S-Y, Cho N-Y, Kim N, Lee HS, Kim D, et al. Influence of IL1B polymorphism on CpG island hypermethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer. *Virchows Arch*. 2010;456(6):647-52.

20. Mattar R, Monteiro MS, Marques SB, Zilberman B, Hashimoto CL, Carrilho FJ. Association of LEC and tnpA *Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population. *Infect Agents Cancer*. 2010;5(1):1.