



## بررسی بیان mRNA سایتوکاین IL-18 در بافت مخاط معدی بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری در استان چهارمحال و بختیاری

نادر باقری<sup>۱</sup>، قربانعلی رحیمیان<sup>۲</sup>، لقمان سلیمزاده<sup>۲</sup>، افشین تقی‌خانی<sup>۲</sup>، مجید مهسا<sup>۲</sup>،  
مرتضی هاشم‌زاده<sup>۲</sup>، فاطمه آزادگان‌دهکردی<sup>۲</sup>، ندا سلیمانی<sup>۲</sup>، هدایت‌الله شیرزاد<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

<sup>۳</sup> بخش پاتولوژی، بیمارستان الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

(دریافت مقاله: ۹۱/۷/۳۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۲۳)

### چکیده

زمینه: عفونت هلیکوباکتریلوری با التهاب معده و ارتشاح سلول‌های پاسخ ایمنی به بافت مخاط معده مرتبط می‌باشد. چندین سایتوکاین از این سلول‌های التهابی ترشح می‌شوند که در نتیجه آن التهاب موضعی به‌وجود آمده، گسترش پیدا کرده و تداوم می‌یابد. عفونت‌های بالینی مختلف ممکن است الگوی بیان سایتوکاینی متفاوتی داشته باشند. گزارش شده که در عفونت هلیکوباکتریلوری سایتوکاین‌هایی مانند IL-1، IL-2، IL-3، IL-4، IL-5، IL-6، IL-7، IL-8، IL-9، IL-10، IL-12، IL-13، IL-14، IL-15، IL-16، IL-17، IL-18، IL-19، IL-20، IL-21، IL-22، IL-23، IL-24، IL-25، IL-26، IL-27، IL-28، IL-29، IL-30، IL-31، IL-32، IL-33، IL-34، IL-35، IL-36، IL-37، IL-38، IL-39، IL-40، IL-41، IL-42، IL-43، IL-44، IL-45، IL-46، IL-47، IL-48، IL-49، IL-50، IL-51، IL-52، IL-53، IL-54، IL-55، IL-56، IL-57، IL-58، IL-59، IL-60، IL-61، IL-62، IL-63، IL-64، IL-65، IL-66، IL-67، IL-68، IL-69، IL-70، IL-71، IL-72، IL-73، IL-74، IL-75، IL-76، IL-77، IL-78، IL-79، IL-80، IL-81، IL-82، IL-83، IL-84، IL-85، IL-86، IL-87، IL-88، IL-89، IL-90، IL-91، IL-92، IL-93، IL-94، IL-95، IL-96، IL-97، IL-98، IL-99، IL-100، IL-101، IL-102، IL-103، IL-104، IL-105، IL-106، IL-107، IL-108، IL-109، IL-110، IL-111، IL-112، IL-113، IL-114، IL-115، IL-116، IL-117، IL-118، IL-119، IL-120، IL-121، IL-122، IL-123، IL-124، IL-125، IL-126، IL-127، IL-128، IL-129، IL-130، IL-131، IL-132، IL-133، IL-134، IL-135، IL-136، IL-137، IL-138، IL-139، IL-140، IL-141، IL-142، IL-143، IL-144، IL-145، IL-146، IL-147، IL-148، IL-149، IL-150، IL-151، IL-152، IL-153، IL-154، IL-155، IL-156، IL-157، IL-158، IL-159، IL-160، IL-161، IL-162، IL-163، IL-164، IL-165، IL-166، IL-167، IL-168، IL-169، IL-170، IL-171، IL-172، IL-173، IL-174، IL-175، IL-176، IL-177، IL-178، IL-179، IL-180، IL-181، IL-182، IL-183، IL-184، IL-185، IL-186، IL-187، IL-188، IL-189، IL-190، IL-191، IL-192، IL-193، IL-194، IL-195، IL-196، IL-197، IL-198، IL-199، IL-200، IL-201، IL-202، IL-203، IL-204، IL-205، IL-206، IL-207، IL-208، IL-209، IL-210، IL-211، IL-212، IL-213، IL-214، IL-215، IL-216، IL-217، IL-218، IL-219، IL-220، IL-221، IL-222، IL-223، IL-224، IL-225، IL-226، IL-227، IL-228، IL-229، IL-230، IL-231، IL-232، IL-233، IL-234، IL-235، IL-236، IL-237، IL-238، IL-239، IL-240، IL-241، IL-242، IL-243، IL-244، IL-245، IL-246، IL-247، IL-248، IL-249، IL-250، IL-251، IL-252، IL-253، IL-254، IL-255، IL-256، IL-257، IL-258، IL-259، IL-260، IL-261، IL-262، IL-263، IL-264، IL-265، IL-266، IL-267، IL-268، IL-269، IL-270، IL-271، IL-272، IL-273، IL-274، IL-275، IL-276، IL-277، IL-278، IL-279، IL-280، IL-281، IL-282، IL-283، IL-284، IL-285، IL-286، IL-287، IL-288، IL-289، IL-290، IL-291، IL-292، IL-293، IL-294، IL-295، IL-296، IL-297، IL-298، IL-299، IL-300، IL-301، IL-302، IL-303، IL-304، IL-305، IL-306، IL-307، IL-308، IL-309، IL-310، IL-311، IL-312، IL-313، IL-314، IL-315، IL-316، IL-317، IL-318، IL-319، IL-320، IL-321، IL-322، IL-323، IL-324، IL-325، IL-326، IL-327، IL-328، IL-329، IL-330، IL-331، IL-332، IL-333، IL-334، IL-335، IL-336، IL-337، IL-338، IL-339، IL-340، IL-341، IL-342، IL-343، IL-344، IL-345، IL-346، IL-347، IL-348، IL-349، IL-350، IL-351، IL-352، IL-353، IL-354، IL-355، IL-356، IL-357، IL-358، IL-359، IL-360، IL-361، IL-362، IL-363، IL-364، IL-365، IL-366، IL-367، IL-368، IL-369، IL-370، IL-371، IL-372، IL-373، IL-374، IL-375، IL-376، IL-377، IL-378، IL-379، IL-380، IL-381، IL-382، IL-383، IL-384، IL-385، IL-386، IL-387، IL-388، IL-389، IL-390، IL-391، IL-392، IL-393، IL-394، IL-395، IL-396، IL-397، IL-398، IL-399، IL-400، IL-401، IL-402، IL-403، IL-404، IL-405، IL-406، IL-407، IL-408، IL-409، IL-410، IL-411، IL-412، IL-413، IL-414، IL-415، IL-416، IL-417، IL-418، IL-419، IL-420، IL-421، IL-422، IL-423، IL-424، IL-425، IL-426، IL-427، IL-428، IL-429، IL-430، IL-431، IL-432، IL-433، IL-434، IL-435، IL-436، IL-437، IL-438، IL-439، IL-440، IL-441، IL-442، IL-443، IL-444، IL-445، IL-446، IL-447، IL-448، IL-449، IL-450، IL-451، IL-452، IL-453، IL-454، IL-455، IL-456، IL-457، IL-458، IL-459، IL-460، IL-461، IL-462، IL-463، IL-464، IL-465، IL-466، IL-467، IL-468، IL-469، IL-470، IL-471، IL-472، IL-473، IL-474، IL-475، IL-476، IL-477، IL-478، IL-479، IL-480، IL-481، IL-482، IL-483، IL-484، IL-485، IL-486، IL-487، IL-488، IL-489، IL-490، IL-491، IL-492، IL-493، IL-494، IL-495، IL-496، IL-497، IL-498، IL-499، IL-500، IL-501، IL-502، IL-503، IL-504، IL-505، IL-506، IL-507، IL-508، IL-509، IL-510، IL-511، IL-512، IL-513، IL-514، IL-515، IL-516، IL-517، IL-518، IL-519، IL-520، IL-521، IL-522، IL-523، IL-524، IL-525، IL-526، IL-527، IL-528، IL-529، IL-530، IL-531، IL-532، IL-533، IL-534، IL-535، IL-536، IL-537، IL-538، IL-539، IL-540، IL-541، IL-542، IL-543، IL-544، IL-545، IL-546، IL-547، IL-548، IL-549، IL-550، IL-551، IL-552، IL-553، IL-554، IL-555، IL-556، IL-557، IL-558، IL-559، IL-560، IL-561، IL-562، IL-563، IL-564، IL-565، IL-566، IL-567، IL-568، IL-569، IL-570، IL-571، IL-572، IL-573، IL-574، IL-575، IL-576، IL-577، IL-578، IL-579، IL-580، IL-581، IL-582، IL-583، IL-584، IL-585، IL-586، IL-587، IL-588، IL-589، IL-590، IL-591، IL-592، IL-593، IL-594، IL-595، IL-596، IL-597، IL-598، IL-599، IL-600، IL-601، IL-602، IL-603، IL-604، IL-605، IL-606، IL-607، IL-608، IL-609، IL-610، IL-611، IL-612، IL-613، IL-614، IL-615، IL-616، IL-617، IL-618، IL-619، IL-620، IL-621، IL-622، IL-623، IL-624، IL-625، IL-626، IL-627، IL-628، IL-629، IL-630، IL-631، IL-632، IL-633، IL-634، IL-635، IL-636، IL-637، IL-638، IL-639، IL-640، IL-641، IL-642، IL-643، IL-644، IL-645، IL-646، IL-647، IL-648، IL-649، IL-650، IL-651، IL-652، IL-653، IL-654، IL-655، IL-656، IL-657، IL-658، IL-659، IL-660، IL-661، IL-662، IL-663، IL-664، IL-665، IL-666، IL-667، IL-668، IL-669، IL-670، IL-671، IL-672، IL-673، IL-674، IL-675، IL-676، IL-677، IL-678، IL-679، IL-680، IL-681، IL-682، IL-683، IL-684، IL-685، IL-686، IL-687، IL-688، IL-689، IL-690، IL-691، IL-692، IL-693، IL-694، IL-695، IL-696، IL-697، IL-698، IL-699، IL-700، IL-701، IL-702، IL-703، IL-704، IL-705، IL-706، IL-707، IL-708، IL-709، IL-710، IL-711، IL-712، IL-713، IL-714، IL-715، IL-716، IL-717، IL-718، IL-719، IL-720، IL-721، IL-722، IL-723، IL-724، IL-725، IL-726، IL-727، IL-728، IL-729، IL-730، IL-731، IL-732، IL-733، IL-734، IL-735، IL-736، IL-737، IL-738، IL-739، IL-740، IL-741، IL-742، IL-743، IL-744، IL-745، IL-746، IL-747، IL-748، IL-749، IL-750، IL-751، IL-752، IL-753، IL-754، IL-755، IL-756، IL-757، IL-758، IL-759، IL-760، IL-761، IL-762، IL-763، IL-764، IL-765، IL-766، IL-767، IL-768، IL-769، IL-770، IL-771، IL-772، IL-773، IL-774، IL-775، IL-776، IL-777، IL-778، IL-779، IL-780، IL-781، IL-782، IL-783، IL-784، IL-785، IL-786، IL-787، IL-788، IL-789، IL-790، IL-791، IL-792، IL-793، IL-794، IL-795، IL-796، IL-797، IL-798، IL-799، IL-800، IL-801، IL-802، IL-803، IL-804، IL-805، IL-806، IL-807، IL-808، IL-809، IL-810، IL-811، IL-812، IL-813، IL-814، IL-815، IL-816، IL-817، IL-818، IL-819، IL-820، IL-821، IL-822، IL-823، IL-824، IL-825، IL-826، IL-827، IL-828، IL-829، IL-830، IL-831، IL-832، IL-833، IL-834، IL-835، IL-836، IL-837، IL-838، IL-839، IL-840، IL-841، IL-842، IL-843، IL-844، IL-845، IL-846، IL-847، IL-848، IL-849، IL-850، IL-851، IL-852، IL-853، IL-854، IL-855، IL-856، IL-857، IL-858، IL-859، IL-860، IL-861، IL-862، IL-863، IL-864، IL-865، IL-866، IL-867، IL-868، IL-869، IL-870، IL-871، IL-872، IL-873، IL-874، IL-875، IL-876، IL-877، IL-878، IL-879، IL-880، IL-881، IL-882، IL-883، IL-884، IL-885، IL-886، IL-887، IL-888، IL-889، IL-890، IL-891، IL-892، IL-893، IL-894، IL-895، IL-896، IL-897، IL-898، IL-899، IL-900، IL-901، IL-902، IL-903، IL-904، IL-905، IL-906، IL-907، IL-908، IL-909، IL-910، IL-911، IL-912، IL-913، IL-914، IL-915، IL-916، IL-917، IL-918، IL-919، IL-920، IL-921، IL-922، IL-923، IL-924، IL-925، IL-926، IL-927، IL-928، IL-929، IL-930، IL-931، IL-932، IL-933، IL-934، IL-935، IL-936، IL-937، IL-938، IL-939، IL-940، IL-941، IL-942، IL-943، IL-944، IL-945، IL-946، IL-947، IL-948، IL-949، IL-950، IL-951، IL-952، IL-953، IL-954، IL-955، IL-956، IL-957، IL-958، IL-959، IL-960، IL-961، IL-962، IL-963، IL-964، IL-965، IL-966، IL-967، IL-968، IL-969، IL-970، IL-971، IL-972، IL-973، IL-974، IL-975، IL-976، IL-977، IL-978، IL-979، IL-980، IL-981، IL-982، IL-983، IL-984، IL-985، IL-986، IL-987، IL-988، IL-989، IL-990، IL-991، IL-992، IL-993، IL-994، IL-995، IL-996، IL-997، IL-998، IL-999، IL-1000.

مواد و روش‌ها: میزان IL-18 mRNA با استفاده از real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت. بدین ترتیب که Total RNA از نمونه‌های بیوپسی ۵۶ بیمار مبتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری و ۵۰ بیمار که از لحاظ ابتلا به هلیکوباکتریلوری منفی بودند اما التهاب معده داشتند با استفاده از معرف biozol طبق دستور کیت استخراج شد. با استفاده از ۱ میلی‌گرم از RNA استخراج شده cDNA اولیه ساخته شد و در مرحله بعد به‌منظور سنجش IL-18 mRNA، ۲ میکرولیتر از cDNA در دستگاه Rotor-Gene با استفاده از پروب اختصاصی و پرایمرهای اختصاصی PCR شد. همچنین ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه بیان IL-18 mRNA در بیوپسی افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری در مقایسه با افراد غیرآلوده به‌طور معنی‌داری بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: IL-18 ممکن است در پاسخ التهابی و پیشرفت پاسخ Th1 بر علیه عفونت هلیکوباکتریلوری، و در ایجاد نتایج بالینی مختلف نقش مهمی داشته باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتریلوری، گاستریت، IL-18 mRNA

\*شهرکرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

## مقدمه

هلیکوباکتریلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی، میکروآئروفیل، خمیده و واجد فلاژل‌های قطبی است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از بافت پوششی انتهای معده انسان جدا شد (۱).

این باکتری یک بیماری‌زای اختصاصی معده انسان بوده که حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است و حدود ۲ تا ۵ درصد از این افراد نهایتاً به سرطان معده دچار می‌شوند. فراوانی کلی عفونت تا حد زیادی به شرایط اقتصادی و اجتماعی وابسته است. انتقال عفونت اغلب از طریق بلع دهانی باکتری کسب شده و اساساً بین افراد خانواده و در ابتدای کودکی انتقال می‌یابد. تحقیقات صورت گرفته تاکنون نشان‌دهنده ارتباط این باکتری با زخم‌های معده‌ای- روده‌ای و نیز سرطان معده می‌باشد.

در بررسی اطلاعات به‌دست آمده از سراسر دنیا مشاهده شد که در سال ۲۰۰۲، ۹۳۴۰۰۰ مورد سرطان معده اتفاق افتاده بود و از این تعداد، سالانه ۷۰۰۰۰۰ مورد به مرگ منتهی شده بود (۶-۱).

مطالعات انجام گرفته در موش‌های که ژن خاصی از آن‌ها مورد هدف قرار گرفته، نشان می‌دهد که سایتوکاین‌های Th1 باعث پیشرفت گاستریت می‌شود در حالی که سایتوکاین‌های Th2 باعث جلوگیری از التهاب معده می‌شود. این گرایش پاسخ Th1 ممکن است در نتیجه افزایش تولید IL-18 در ناحیه آنتروم معده در پاسخ به عفونت هلیکوباکتریلوری ایجاد شود (۷).

IL-18 سایتوکاینی است که اخیراً در مواجهه‌ی سلول‌های کبد موش‌های آزمایشگاهی با لیپوپلی‌ساکارید پروپیونی باکتریوم آکنه شناسایی شد. IL-18 از لحاظ ساختار و عملکرد مشابه خانواده IL-1 $\beta$  می‌باشد (۸).

IL-18 همانند IL-1 $\beta$  از لحاظ بیولوژیکی به‌صورت یک پیش‌ساز پروتئینی ۲۴ کیلودالتونی سنتز می‌شود. تبدیل این پروتئین به فرم فعال ۱۸ کیلودالتونی به‌وسیله‌ی آنزیم مبدل IL-1 $\beta$  (کاسپاز ۱) انجام می‌شود (۹) که این برش برای فعالیت بیولوژیکی IL-18 ضروری است.

IL-18 با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و افزایش پاسخ Th1 در دفاع بر علیه پاتوژن‌ها نقش عمده‌ای بازی می‌کند (۱۳-۱۰).

IL-18 و IL-12 با اثر همسو باعث افزایش سیتوتوکسیسیته‌ی سلول‌های NK و تولید INF- $\gamma$  از این سلول‌ها می‌شوند (۱۴). بسیاری از پاسخ‌های سلولی IL-18 مشابه عملکرد بیولوژیکی IL-12 می‌باشد (۱۵). با این وجود نقش کمک محرکی آن به‌منظور ازدیاد سلول‌های Th1 و تولید INF- $\gamma$  توسط این سلول‌ها به فعالیت‌های IL-12 وابسته است (۱۶). دلیل اساسی مبنی بر اینکه عدم تعادل در پاسخ Th1 و Th2 ممکن است منجر به اختلالات مزمن مانند التهاب خودایمن تیروئید و بیماری التهاب روده شود، وجود ندارد (۱۷ و ۱۸). پاسخ ایمنی به هلیکوباکتریلوری مهم‌ترین فاکتور مؤثر در آسیب بافت موکوس معده می‌باشد (۱۹). عفونت مزمن با هلیکوباکتریلوری با تولید INF- $\gamma$  تولید شده به‌وسیله سلول‌های T (۲۰-۲۲) و افزایش موکوسی IL-12 ارتباط داشته و نشان‌دهنده پاسخ عمده‌ی Th1 می‌باشد (۲۳-۲۵).

میزان بیان mRNA IL-12 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری با فاکتور ویرولانس CagA در مقایسه با افراد آلوده CagA منفی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۳) که در نهایت منجر به تنظیم بیان رسپتورهای IL-18 در سطح سلول‌های Th1 و NK

می‌شود (۲۶).

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که IL-18 در بیماری Crohn نقش دارد به طوری که سطح بالایی از پروتئین IL-18 در حالت فعال این بیماری وجود دارد اما در اولسکولیت این حالت مشاهده نمی‌شود (۲۷ و ۲۸). هدف از انجام این مطالعه مقایسه بیان mRNA IL-18 در بیماران دارای التهاب معده مبتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری و بیماران دارای التهاب معده اما بدون عفونت هلیکوباکتریلوری می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌گیری

از ۵۶ بیمار دارای گاستریت مبتلا به هلیکوباکتریلوری و همچنین ۵۰ بیمار دارای گاستریت که از لحاظ عفونت به هلیکوباکتریلوری منفی بودند، به روش آندوسکوپی بیوپسی گرفته شد. معیار خروج در این مطالعه بیمارانی بودند که در دو ماه اخیر عوامل ضدترشعی، درمان ضد میکروبی مانند آنتی بیوتیک‌ها یا بیسموت و داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی دریافت کرده‌اند. نمونه‌های بیوپسی گرفته شده فوراً در تانک نیتروژن مایع فریز شدند تا در مراحل بعد RNA آنها استخراج شود.

تست اوره از سریع بروی بیوپسی گرفته شده از معده انجام شد و نمونه‌ها از لحاظ تشخیص باکتری و تعیین درجه التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه‌بندی شدند (۲۹).

تشخیص هلیکوباکتریلوری در نمونه بافتی علاوه بر رنگ آمیزی گیمسای اصلاح شده به روش PCR انجام شد. به منظور تشخیص هلیکوباکتریلوری نمونه بیوپسی از بیمار در کوتاه‌ترین زمان ممکن به منظور انجام تست‌های مولکولی به مرکز تحقیقات سلولی و

مولکولی دانشکده پزشکی انتقال داده شد. به کمک کیت استخراج DNA از بافت (Bioflux-Japan) DNA ژنومی بافت معده بیماران استخراج شد و در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات نگهداری شد. پس از آن حضور یا عدم حضور باکتری در نمونه‌ها با بررسی حضور ژن‌های UreA و 16s rRNA به روش PCR ساده به ترتیب با کمک پرایمرهای HP1\HP2 و HP1-f\HP64-r بررسی گردید (۳۰).

### استخراج RNA و تهیه cDNA

استخراج کل RNA با استفاده از محلول Biozol (Bioflux-Japan) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (nanodropspectrometer, USA) تعیین و نسبت جذب نوری (Optical Density) RNA در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. از نمونه‌هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آن‌ها بین ۱/۸ تا ۲/۲ بود برای سنتز cDNA استفاده گردید. در این مطالعه مقدار ۱ میکروگرم از RNA با استفاده از پرایمر Random Hexamer (Fermentas Revert) AidTM First Strand cDNA synthesis Kit طبق پروتکل شرکت سازنده به cDNA تک رشته‌ای تبدیل شد. در اینجا دو مرحله انکوباسیون وجود داشت: در ابتدا مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و انکوباسیون دوم ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در نهایت، واکنش با ۱۰ دقیقه حرارت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به پایان رسید. cDNA سنتز شده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد

NCBI و پایگاه اطلاعاتی PERLPRIMER

برای مصارف بعدی نگهداری شد.

طراحی (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

### پرایمرها

پرایمرها انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

در این مطالعه ژن IL-18 به عنوان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت. سپس توسط نرم افزار GENERUNNER.

جدول ۱) توالی پرایمرها و پروب

Forward $\beta$ -actin	5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3
Reverse	5-CTGGTGCCTGGGGCG-3
Probe	FAM-CGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA
IL-18 Forward	5-GACCAAGGAAATCGGCCTCTA-3
Reverse	5 CCATACCTCTAGGCTGGCTATCTT-3
Probe	FAM-ATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGAC-TAMRA

شد. در نهایت اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از برنامه نرم افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، IL، USA) ویرایش ۱۶ با استفاده از آزمون Mann-Whitney U از نظر بیان ژن در دو گروه مختلف بررسی گردید. برای تهیه شکل های مربوطه از نرم افزار GraphPad Prism 5 Demo استفاده شد.

### واکنش Real-Time PCR (TaqmanProb)

تمام واکنش های Real-Time PCR در دستگاه تمام واکنش های Rotor Gene TM 3000 (Corbett) انجام شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه که منجر به واسرشتگی (Denaturation) مولکول های cDNA می شود، مرحله دوم ۴۵ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای جفت شدن (Annealing) و گسترش (Extension) انجام شد. این واکنش ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوب های ۰/۱ میلی لیتری انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X- rotor gene-Germany)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۰/۲ میکرولیتر از پروبها با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۷ میکرولیتر آب RNase free DNase، ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود. آن گاه نمونه مورد نظر در آنالیز قرار داده شد و ۴۵ سیکل تکثیر گردید. برای آنالیز داده ها ابتدا،  $\Delta Ct$  ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن  $\beta$ -actin به عنوان ژن رفرنس محاسبه

### یافته ها

مشخصات جنسیت بیماران در دو گروه آلوده و غیر آلوده در جدول ۲ ارائه شده که در کل شامل ۴۷ بیمار مرد و ۶۱ بیمار زن می باشد. میانگین و انحراف معیار سن بیماران در گروه آلوده  $۲/۰۵ \pm ۴۲/۲$  و در گروه غیر آلوده  $۲/۳۶ \pm ۳۹/۱$  بود.

جدول ۲) محاسبه آماری فراوانی جمعیت مورد مطالعه

کل	جنسیت		
	مرد	زن	
۵۶	۲۳	۳۳	آلوده
۵۰	۲۴	۲۶	غیر آلوده
۱۰۶	۴۷	۵۹	کل

بیان **IL-18 mRNA** در افراد آلوده

هلیکوباکتریلوری و افراد غیر آلوده

آنالیز آماری نشان داد (جدول ۳) که تفاوت معنی داری

هلیکوباکتریپیلوری بیشتر است. این امر نشان می‌دهد که هلیکوباکتریپیلوری در افزایش IL-18 نقش دارد. همچنین ثابت شده است که رونوشت‌های IL-18 در موکوس ایلئوم و روده و همچنین سلول‌های پانکراس، کلیه، کبد و انواع دیگری از سلول‌ها بالا می‌رود (۲۷، ۳۲ و ۳۴).

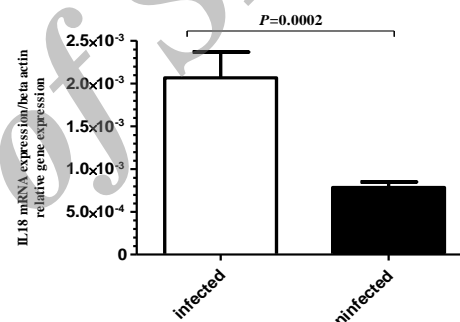
ممکن است نیمه عمر mRNA IL-18 برخلاف بسیاری از سایتوکاین‌ها طولانی باشد (۳۳). در حقیقت ناحیه ۳' IL-18 که ترجمه نمی‌شود فاقد توالی AUUUA که یک توالی ناپایدار کننده است، می‌باشد. سطح بالای رونوشت‌های IL-18 در بافت‌های عفونی و غیر عفونی بیانگر این مطلب است که احتمالاً فعالیت بیولوژیکی این سایتوکاین بعد از ترجمه کنترل می‌شود. سطح بالای رونوشت IL-18 در معده نسبت به IL-12 بالاتر است (۲۳). اما در مطالعه انجام شده، افزایش بیان IL-12 در عفونت با سوش‌هایی از هلیکوباکتریپیلوری که دارای فاکتور ویروالانس cagA می‌باشند در ارتباط است (۲۳).

IL-18 برای فعال شدن از نظر بیولوژیکی نیازمند فرآیند آنزیمی پس از ترجمه می‌باشد (۳۵). تجزیه و تحلیل حاصل از بیوپسی نمونه‌های به دست آمده از آنترال معده وجود ایزوفرم بالغ ۱۸ کیلودالتونی IL-18 را در موارد مثبت و منفی هلیکوباکتریپیلوری نشان می‌دهد. با این وجود مطالعات قبلی بر روی موکوس روده در بیماران دارای التهاب روده‌ی بزرگ بیان IL-18 را ۱۸ کیلودالتونی را نشان می‌دهد (۲۷). اما پیش‌ساز ۲۴ کیلودالتونی IL-18 در موکوس روده‌ای افراد سالم نیز یافت شده است (۲۷ و ۲۸). تکنیک‌های کمی مانند الایزا به منظور تشخیص IL-18 نمی‌تواند بین پیش‌ساز IL-18 و IL-18 بالغ افتراق حاصل کند. در بیماری Crohn که در آن میزان بالای پروتئین

بین میزان بیان mRNA IL-18 در افراد دارای گاستریت با عفونت هلیکوباکتریپیلوری و افراد دارای گاستریت فاقد عفونت ( $P=0/0002$ ) وجود دارد (شکل ۱).

جدول ۳) محاسبه آماری بیان mRNA IL18 در افراد آلوده

		و غیر آلوده		
IL18	آلوده	تعداد افراد	تعداد باکتری	P
	آلوده	۵۶	۹/۷۱	۰/۱۷
	غیر آلوده	۵۰	۱۰/۴۹	۰/۲۱



شکل ۱) بیان IL18 mRNA در بیوپسی بیماران مبتلا و غیر مبتلا به هلیکوباکتریپیلوری

## بحث

IL-18 یک سایتوکاین تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی با اثر چندگانه است که در بیماری‌های اتوایمیون و بیماری‌های عفونی به ترتیب مانند Crohn، آرتریت روماتوئید و توبرکولوزید لپرماتوز در بدن انسان افزایش می‌یابد (۲۷، ۲۸، ۳۱ و ۳۲).

در این مطالعه سطح رونوشت IL-18 در بیوپسی بیماران دارای التهاب معده مبتلا به عفونت هلیکوباکتریپیلوری و بیماران دارای التهاب معده اما بدون عفونت هلیکوباکتریپیلوری تعیین و مشخص شد که بیان سطح mRNA در بیماران مبتلا به عفونت

می‌تواند پاسخ ویژه سلول‌های T را به هلیکوباکتریپیلوری ایجاد کنند، را تحت تأثیر قرار دهد (۴۱-۳۹). به‌علاوه IL-18 مستقیماً تولید سایتوکاین‌های IL-1، IL-6 و TNF- $\alpha$  از ماکروفاژهایی که قابلیت افزایش گاستریت و کاهش تعداد باکتری را دارد، تقویت می‌کند (۴۲).

نقش عملکردی IL-18 در ایجاد التهاب معده و ارتباط سلول‌های مختلف در تولید IL-18 و ارتباط این سایتوکاین با فاکتورهای ویروالانس باکتری نیازمند تحقیقات بیشتر است.

### نتیجه‌گیری

IL-18 ممکن است در پاسخ‌های التهابی معده و افزایش پاسخ Th1 به کلونیزه شدن هلیکوباکتریپیلوری در معده نقش مهمی ایفا کند. همچنین این اینترلوکین ممکن است نتیجه بیماری‌های مرتبط با عفونت هلیکوباکتریپیلوری را که در بافت التهابی معده ایجاد می‌شوند تحت تأثیر قرار دهد.

### سپاس و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مؤلف اول با شماره ۱۴۶ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی به انجام رسید، که بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت و مرکز تحقیقاتی اعلام می‌نمایند.

IL-18 با استفاده از وسترن بلات به اثبات رسیده، ارزیابی پروتئین کامل IL-18 در نمونه‌های بیوپسی به‌روش الیزا کاهش IL-18 را نشان می‌دهد (۲۷ و ۲۸). از سوی دیگر سایتوکاین‌های تنظیمی و پیش‌التهابی سیستم ایمنی که به‌وسیله هلیکوباکتریپیلوری تحریک می‌شوند ممکن است پاسخ طبیعی موضعی سلول‌های T را تحت تأثیر قرار دهد. از آنجایی که مشخص شده بیان IFN- $\gamma$  برخلاف IL-5 و IL-4 در گاستریت ناشی از هلیکوباکتریپیلوری افزایش پیدا می‌کند، پاسخ Th موضعی در عفونت هلیکوباکتریپیلوری به‌طور معمول Th1 در نظر گرفته می‌شود (۳۶). در این مطالعه افزایش بیان IL-18 در نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به گاستریت آلوده به هلیکوباکتریپیلوری مشاهده شد. در دیگر مطالعات گزارش شده که سطح سرمی IL-18 به‌طور معناداری در بیماران مبتلا به کارسینومای معده که با عفونت هلیکوباکتریپیلوری ارتباط داشتند افزایش یافته است (۳۷). به نظر می‌رسد که IL-18 برای تولید ویژه IFN- $\gamma$  ضروری می‌باشد زیرا در موش‌هایی که از لحاظ IL-18 غیرفعال شده بودند سطح IFN- $\gamma$  کاهش پیدا کرد. در صورتی که بیان بالای IL-18 در موش‌های ترانس ژن که موجب سطح بالای IFN- $\gamma$  شد به‌طور واضح نشان می‌دهد که رابطه‌ی قوی بین IL-18 و توانایی آن در تولید IFN- $\gamma$  وجود دارد (۳۸). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که IFN- $\gamma$  می‌تواند بیان موضعی سایتوکاین‌ها، رسپتورهای کموکاین/سایتوکاین، بیان MHC کلاس II، مولکول‌های غشایی و کمک تنظیم کننده را که

### References:

1. Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol 2009; 44: 239-48.
2. Delport W, Cunningham M, Olivier B, et al. A population genetics pedigree perspective on the transmission of Helicobacter pylori. Genetics 2006; 174: 2107-18.
3. Bagheri N, Rahimian G, Salimzadeh L, Azadegan F, Rafieian-Kopaei M, Taghikhani A, Shirzad H: Association of the virulence factors of

- Helicobacter pylori* and gastric mucosal interleukin-17/23 mRNA expression in dyspeptic patients. *Excli Journal*. 12 (2013) 5-14.
4. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* vacA increase markedly gastric mucosal TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in gastritis patients. *Microb Pathog* 2014; 67-68: 1-7.
  5. Pakbaz Z, Shirazi MH, Pourmand MR, et al. Evaluation of Rapid Urease Test Compared with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *ISMJ* 2014; 16: 394-400.
  6. Farshad S, Alborzi A, Malek Hossaini A, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in gallstones using Multiplex PCR. *ISMJ* 2006; 8: 103-9.
  7. Tomita T, Jackson AM, Hida N, et al. Expression of Interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 2001; 183: 620-7.
  8. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect immun* 1995; 63: 3966-72.
  9. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al. Caspase-1 processes IFN- $\gamma$ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  production. *Nature* 1997; 386: 619-23.
  10. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; 9: 143-50.
  11. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998; 8: 383-90.
  12. Kappes MA. Immunomodulatory effects of porcine interleukin-18 on a modified live vaccine immune response against swine influenza virus [dissertation]. Ames: Iowa State Univ., 2009
  13. Bagheri N, Taghikhani A, Rahimian G, et al. Association between virulence factors of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal interleukin-18 mRNA expression in dyspeptic patients. *Microb Pathog* 2013; 65: 7-13.
  14. Bouzgarrou N, Hassen E, Schvoerer E, et al. Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection. *J medi virol* 2008; 80: 607-14.
  15. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11-24.
  16. Xu Q, Tin SK, Paramalingam SP, et al. Interleukin-18 promoter gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: association with CC genotype at position-607. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 91-5
  17. Matsuura E, Kang Y, Kitakawa H, et al. Modulation of T cell function by alpha-fetoprotein: an in vivo study on porcine thyroid peroxidase-induced experimental autoimmune thyroiditis in transgenic mice producing human alpha-fetoprotein. *Tumor biol* 1999; 20: 162-71.
  18. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am j pathol* 1997; 150: 823-32.
  19. Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD, et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effect of bacterial eradication. *Helicobacter* 2002; 7: 342-8.
  20. Lizza F, Parrello T, Sebkova L, et al. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 14-20.
  21. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-92.
  22. D'Elis MM, Manghetti M, De Carli M, et al. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 1997; 158: 962-7.
  23. Hida N, Shimoyama T Jr, Neville P, et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *J clin pathol* 1999; 52: 658-64.
  24. Bagheri N, Salimzadeh L, Azadegan-Dehkordi F, et al. Expression levels of mRNA cytokines of IL-17 and IL-23 in epithelial fiber of stomach in patients with *Helicobacter pylori* using Real-Time PCR in Chahar Mahal and Bakhtiari province. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 15: 124-31.



25. Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, et al. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 316-23.
26. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 2012; 122: 1271-82.
27. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-7.
28. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162: 6829-35.
29. Sugimoto M, Wu JY, Abudayyeh S, et al. Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 738-42.
30. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2543-9.
31. Paramalingam SS, Thumboo J, Vasoo S, et al. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 96-9.
32. García VE, Uyemura K, Sieling PA, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol* 1999; 162: 6114-21.
33. Tone M, Thompson S, Tone Y, et al. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* 1997; 159: 6156-63.
34. Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156: 4274-9.
35. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 $\beta$ : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 1999; 19: 1-11.
36. Karttunen R, Karttunen T, Ekre H, et al. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* 1995; 36: 341-5.
37. Kawabata T, Ichikura T, Majima T, et al. Preoperative serum interleukin-18 level as a postoperative prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2050-5.
38. Akhiani AA, Schön K, Lycke N. Vaccine-induced immunity against *Helicobacter pylori* infection is impaired in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 2004; 173: 3348-56.
39. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* 1997; 158: 1541-50.
40. Engstrand L, Scheynius A, Pålsson C, et al. Association of *Campylobacter pylori* with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57: 827-32.
41. Ye G, Barrera C, Fan X, et al. Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* 1997; 99: 1628-36.
42. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, et al. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 711-21.



Original Article

## Expression of IL-18 cytokine mRNA in gastric mucosa tissue of patients with *H. pylori* infection in Chahar Mahal and Bakhtiari

N. Bagheri<sup>1</sup>, Gh. Rahimian<sup>2</sup>, L. Salimzadeh<sup>2</sup>, A. Taghikhani<sup>2</sup>,  
M. Mahsa<sup>2</sup>, M. Hashemzadeh<sup>2</sup>, F. Azadegan-Dehkordi<sup>2</sup>, N. Solimani<sup>3</sup>,  
H. Shirzad<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

<sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN

<sup>3</sup>Department of pathology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, IRAN

(Received 21 Oct, 2012      Accepted 13 Dec, 2012)

### Abstract

**Background:** *H. pylori* infection is associated with gastritis and marked infiltration of the gastric mucosa by inflammatory cells secreting of several cytokines that contribute to maintain and expand the local inflammation. Different clinical expressions of the infection may reflect different patterns of cytokine expression. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-17, IL-23, and IL-18 have been reported to be involved in *H. pylori*-induced gastric mucosal inflammation, but the details and relation to different patterns of inflammation remain unclear.

**Materials and Methods:** Analysis of IL-18 RNA transcripts was performed by real-time PCR. Total RNA was extracted from gastric biopsies of 56 *H. pylori*-infected patients, 50 *H. pylori*-negative patients with gastritis, by biozol reagent according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 mg of total RNA using First Strand cDNA Synthesis Kit (fermentas) and 3  $\mu$ L cDNA was amplified by PCR using the 2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (QIAGEN) and specific primers for each cytokine and  $\beta$ -actin.

**Results:** IL-18 mRNA expression was significantly increased in biopsies of *H. pylori*-infected patients compared to *H. pylori*-uninfected individuals.

**Conclusion:** IL-18 may play an important role in the inflammatory response and promoting gastric Th1 responses to *H. pylori* colonization, and may ultimately influence the outcome of *H. pylori*-associated diseases that arise within the context of gastritis.

**Key Words:** Helicobacter pylori, gastritis, IL-18, mRNA

\*Address for correspondence: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN; Email:shirzad1951@yahoo.com