Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۶، ص ۷۱۳-۷۰۳، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر پلی‌مورفیسم Asp299Gly ژن TLR4 بر بیان IL-6 و IL-18 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری

قربانعلی رحیمیان[1]، نادر باقری[2]، ابوالفضل قلی‌پور[3]، هدایت‌الله شیرزاد*[1]

خلاصه

مقدمه: هلیکوباکترپیلوری با زخم گوارشی و سرطان معده همراه می‌باشد. پلی‌مورفیسم در ژن‌های کد کننده گیرنده‌های شبه تول ممکن است بر پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی مؤثر بوده و در استعداد ابتلا به هلیکوباکترپیلوری و نتایج بیماری تأثیر داشته باشند. اما جزئیات و همراهی پلی‌مورفیسم‌های مختلف و نتایج بالینی متفاوت در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری هنوز نامشخص است. هدف از این مطالعه تأثیر پلی‌مورفیسم TLR-4 Asp299Gly بر بیان سایتوکاین‌های اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری در مقایسه با بیماران غیرآلوده می‌باشد.

روش: در این مطالعه موردی- شاهدی، از ۵۸ بیمار آلوده به هلیکوباکترپیلوری و ۴۴ بیمار غیرآلوده بیوپسی جمع‌آوری شد. ژنوتیپ پلی‌مورفیسم نقطه‌ای TLR-4 Asp299Gly به‌روش PCR-RFLP بررسی شد. سطح بیان mRNA مخاطی سایتوکاین‌های اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ توسط real-time PCR اندازه‌گیری شد. بیان سایتوکاین‌ها در دو گروه آلوده و غیرآلوده با استفاده از t-Test مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های D/D و D/G در گروه بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری و بیماران غیرآلوده به‌ترتیب ۵۵/۲، ۴۴/۸، ۷۷/۲ و ۲۲/۸ درصد بود. سطح بیان اینترلوکین-۶ در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری با پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (P=۰/۰۰۱). ولی ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان اینترلوکین-۱۸ و پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری دیده نشد (P= ۰/۴۱۹). به‌علاوه ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ و پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم نقطه‌ای در ژن TLR-4 باعث افزایش بیان ژن سایتوکاین اینترلوکین-۶ می‌شود و افزایش این سایتوکاین التهابی ممکن است نقش مهمی در ایجاد التهاب معده همراه با هلیکوباکترپیلوری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، پلی‌مورفیسم، اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۸، گیرنده شبه تول شماره ۴، التهاب معده

۱- استادیار گروه داخلی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۲- دانشجوی دکترای ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت و مرکز تحقیقات ایمونولوژی ،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ۳- استادیار گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۴- استاد گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: shirzad1951@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۷/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتری هلیکوباکترپیلوری به‌عنوان علت معمول در ابتلا به گاستریت مزمن شناخته شده است. این باکتری به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در ایجاد التهاب معده، زخم معده و دئودنوم نام برده می‌شود (۴-۱). این باکتری حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است (۵،۶). پذیرنده‌های شبه Toll (TLR) یک گروه از پروتئین‌های گیرنده متصل به غشاء هستند که در پاسخ‌های ایمنی ذاتی مشارکت دارند و تا کنون ۱۱ عضو آنها شناسائی شده است. پذیرنده‌های TLRها که بر سطح سلول‌های اپیتلیال معده و سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته در مخاط معده بیان شده و به‌عنوان خط اول دفاعی میزبان بر علیه هلیکوباکترپیلوری شناخته شده‌اند. در چندین مطالعه اثرات متناقضی در رابطه با TLR-4 در فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی بر علیه هلیکوباکترپیلوری گزارش شده است (۸،۷). موتاسیون‌های TLR-4 باعث کاهش شناسائی LPS هلیکوباکترپیلوری و همچنین کاهش فعال‌سازی NF-kB درون سلولی و به‌علاوه کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی مختلف می‌گردد و فرد را مستعد ابتلا به فرم‌های خاصی از بیماری می‌نماید (۹). ژن TLR-4 شامل ۳ اگزون بوده و بر روی کروموزوم 9q32-33 قرار دارد. مطالعات نشان می‌دهد که تاکنون دو جایگاه پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) غیرمترادف شامل A896G (rs4986790) و C1196T (rs4986791) در اگزون شماره ۳ ژن TLR-4 شناسائی شده است که به‌ترتیب منجر به جایگزینی آسپارتیک اسید شماره ۲۹۹ به گلاسین و ترئونین ۳۹۹ به ایزولوسین می‌شود. جایگزینی اسیدآمینه آسپارتیک اسید به‌جای اسیدآمینه گلیسین در موقعیت ۲۹۹ از توالی آمینواسید (D299G) در اثر تبدیل A-G در جفت باز ۸۹۶ صورت می‌گردد (۱۰). IL-6 یک سایتوکاین با خاصیت چند عملکردی می‌باشد، که توسط سلول‌های ایمنی و غیرایمنی تولید می‌شود و نقش آن به‌عنوان یک واسطه التهابی و آندوکرینی و تنظیم‌گر عملکردی متابولیکی می‌باشد (۱۱). مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که بیان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 در افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین افزایش بیان این سایتوکاین‌ها در افراد به هلیکوباکترپیلوری باعث تشدید التهاب معده می‌شود (۱۲, ۱۳). IL-18 با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و افزایش پاسخ سلول‌های Th1 در دفاع بر علیه عفونت هلیکوباکترپیلوری نقش مهمی بازی می‌کند (۱۴). با توجه به میزان بالای بیماران با مشکلات معده‌ای- روده‌ای در استان چهار محال و بختیاری که ممکن است آنان را مستعد ابتلا به سرطان معده نماید، به‌نظر می‌رسد که از اطلاعات به‌دست آمده در رابطه با وضعیت ژنوتیپی بیماران به لحاظ پلی‌مورفیسم ژن‌های TLR-4 و ارتباط آنها با بیان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18، بتوان جهت پیشگیری بیماران استفاده و نسبت به اقدامات پیشگیرانه معمول یا شناسائی بیماری در مراحل اولیه اقدام نمود. توسعه مطالعات در این زمینه، از طریق افزایش دانسته‌های ما در رابطه با مکانیسم بیماری‌زایی هلیکوباکترپیلوری ممکن است به پیداکردن راهکارهای مناسب درمانی کمک کند.

روش انجام آزمایش

نمونه‌گیری

در این مطالعه مورد- شاهدی، از ۱۰۲ بیمار دارای مشکلات معدی-روده‌ای مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوبی بیمارستان هاجر شهرکرد (نمونه‌گیری در دسترس) به

www.SID.ir

Archive of SID

روش آندوسکوپی از قسمت انتهای معده بیوپسی گرفته شد. گروه‌ها شامل: گروه هلیکوباکترپیلوری مثبت دارای التهاب معده به تعداد ۵۸ نفر (۲۳ مرد و ۳۵ زن) با میانگین سن ۱۵/۴۱ ±۴۱/۷۱ و گروه هلیکوباکترپیلوری منفی به تعداد ۴۴ نفر (۲۰ مرد و ۲۴ زن) با میانگین سنی ۱۶/۶۹ ±۳۸/۱۴ بودند. بیمارانی که در دو ماه اخیر عوامل ضد ترشحی، درمان ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها یا بیسموت و داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی دریافت کرده بودند از مطالعه خذف شدند. نمونه‌های بیوپسی گرفته شده فوراً در تانک نیتروژن مایع فریز شدند تا در مراحل بعد RNAی آنها استخراج شود. تشخیص هلیکوباکترپیلوری بر اساس تست اوره‌آز سریع و تهیه لام رنگ‌آمیزی شده از بیوپسی برای تشخیص باکتری در بافت معده و تعیین درجه التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه‌بندی شدند (۱۵). بیمارانی که تست‌های اوره‌آز و پاتولوژی آنها از لحاظ تشخیص هلیکوباکترپیلوری مثبت باشد در گروه افراد آلوده و آنهایی که هر دو تست منفی باشند در گروه غیرآلوده قرار گرفتند. بیمارانی که یکی از تست‌های نام برده مثبت و تست دیگر منفی باشد، در این مطالعه وارد نشدند. این طرح مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد قرار گرفت و از کلیه بیماران جهت ورود رضایت نامه کتبی اخذ گردید.

استخراج RNA و تهیه cDNA

به‌منظور پایدار کردن mRNA یکی از بیوپسی‌ها بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در محلول Biozol قرار گرفت و فوراً به فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و نهایتاً به کمک محلول نامبرده، Total RNA از بافت بیوپسی استخراج گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان Total RNA اندازه‌گیری و سپس ۳ µl از total RNA را با استفاده از کیت Revertaid First cDNA synthesis (#K1632, Fermentase) طبق روش مندرج در برشور شرکت سازنده کیت به cDNA تبدیل شد. پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. و تمام واکنش‌های real-time PCR در دستگاه Rotor Gene TM 3000 (Corbett) انجام گردید. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول که منجر به واسرشتگی (Denaturation) مولکول‌های cDNA می‌شود، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۴۵ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای جفت شدن (Annealing) و گسترش (Extension) انجام شد. این واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵µl در میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی‌لیتری انجام گردید. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲µl از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۴ µl از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ pm و ۰/۲µl از پروب با غلظت ۱۰ pm، ۷µl آب free RNase /DNase و ۲µl cDNA به‌عنوان الگو استفاده و سپس نمونه مورد نظر در دستگاه قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده و ژن β-actin به‌عنوان ژن رفرانس در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. *توالی پرایمرها و پروب‌های بکار رفته در این مطالعه*

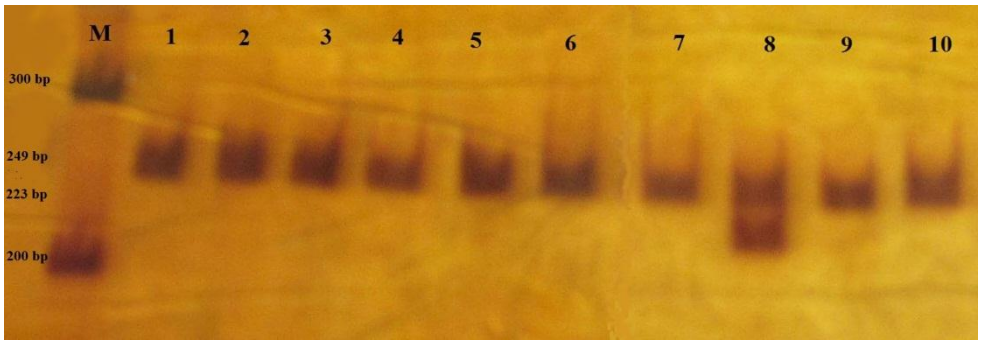
ژن‌ها	توالی پرایمرها و پروب‌ها
β-actin	Forward 5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3 Reverse 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3 Probe FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA
IL-6	Forward 5- GGTACATCCTCGACGGCATCT-3 Reverse 5- GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3 FAM-TGTTACTCTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGCT- Probe TAMRA
IL-18	Forward 5-GACCAAGGAAATCGGCCTCTA-3 Reverse 5 CCATACCTCTAGGCTGGCTATCTT-3 Probe FAM- ATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGAC-TAMRA

روش Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

در این مطالعه از روش PCR-RFLP برای شناسایی پلی‌موفیسم TLR-4 Asp299Gly استفاده گردید. پرایمرهای پیش برنده 5-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3 و پرایمر معکوس 5-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3 برای تکثیر قطعه ۲۴۹ bp استفاده شدند (۱۷). هر میکروتیوپ PCR حاوی ۱µl از هر یک از دو آغازگر F و R با غلظت ۵۰pm، ۰/۵ µl آنزیم Taq پلی مراز (5unit/ µl)، ۰/۵µl مخلوط دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۱۰ mM، ۲µl بافر PCR (۱۰X)، ۲µl از MgCl2 (۵۰mM) و ۳µl از DNA (۱۰۰ ngr) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ µl رسید. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ASTEC, (PC818-Japan) انجام شد. برنامه PCR، شامل ۳۵ سیکل با برنامه ۱۰ دقیقه ۹۵ درجه، ۱ دقیقه ۹۵ درجه، ۱ دقیقه ۶۵ درجه، و ۱ دقیقه ۷۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه بود. بعد از از انجام PCR، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه‌ها روی ژل ۸ درصد اکریل‌آمید الکترفورز گردیدند، سپس باقیمانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت ۳ ساعت در مجاورت آنزیم NcoI گرفت. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات مجدداً روی آکریل‌آمید ۸ درصد الکترفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای مشاهده شامل: سه باند ۲۴۹ bp، ۲۲۳ bp و ۲۶ bp که نشان دهنده نوع هتروزیگوت (D/G)، تک باند ۲۴۹ bp نشان دهنده هموزیگوت طبیعی (D/D) و دو باند ۲۲۳ bp و ۲۶ bp نشان دهنده هموزیگوت موتانت (GG) بود. (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. *الکتروفورز محصولات PCR-RFLP به‌منظور بررسی حضور پلی‌مورفیسم در ژن TLR4. همان‌گونه که مشاهده می‌شود نمونه ۸ دارای ژنوتیپ D/G و بقیه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ D/D می‌باشند. (لازم به ذکر است به خاطر کوچک بودن قطعه ۲٦bp، این قطعه از ژل الکتروفورز خارج شده و قابل شناسایی نبود)*

آنالیز داده‌ها

پس از ثبت اطلاعات مورد نظر از بیماران در فرم‌های مخصوص برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افـزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. برای بررسی ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 از آزمون آماری t-test استفاده و P<۰/۰۵ معنـی‌دار در نظـر گرفته شد.

نتایج

نتایج به‌دست آمده از **PCR-RFLP** فراوانی ژنوتیپ‌های D/D و D/G در گروه بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری و گروه غیرآلوده به ترتیب ۵۵/۲، ۴۴/۸ و در گروه غیرآلوده ۷۷/۲ و ۲۲/۸ بود (جدول ۲).

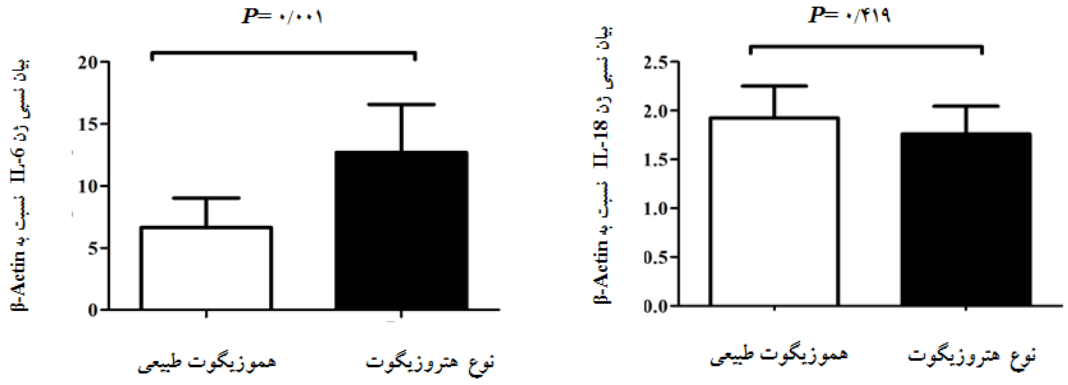
جدول۲. *فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف TLR4 در گروه آلوده و غیرآلوده*

ژنوتیپ TLR4	غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری	آلوده به هلیکوباکترپیلوری
D/D	۳۴ (۷۷/۲)	۳۲ (۵۵/۲)
D/G	۱۰ (۲۲/۸)	۲۶ (۴۴/۸)
G/G	۰	۰
کل	۴۴ (۱۰۰)	۵۸ (۱۰۰)

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن سایتوکاین IL-6 در نمونـــه‌هـــای بیوپســـی بیمـــاران مبـــتلا بـــه هلیکوباکترپیلوری با پلی‌مورفیسم TLR-4 نوع هتروزیگوت (D/G) در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری بـا نوع هموزیگوت طبیعی (D/D) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). اما ارتباط معنی‌داری در بیـان ژن سـایتوکاین IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری دیده نشـد (P=۰/۴۱۹) (شکل۲).

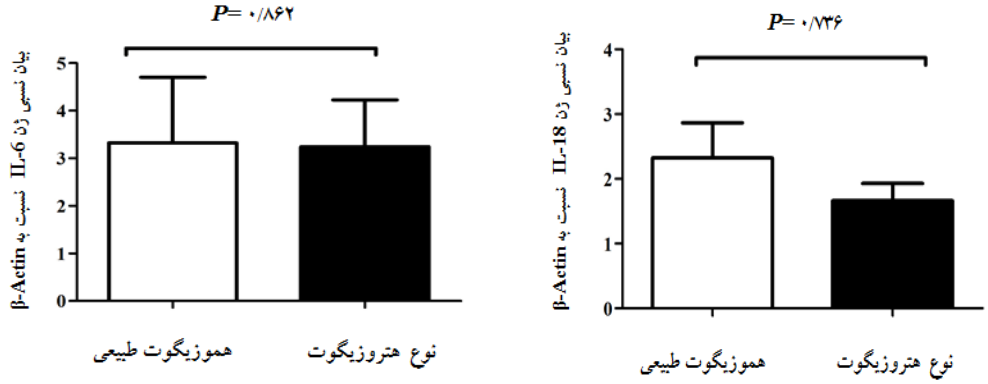
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. *ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با پلی‌موفیسم در ژن TLR-4 در بیماران آلوده به عفونت هلیکوباکترپیلوری*

مطالعه ما همچنین نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری وجود ندارد (شکل ۳).



شکل ۳. *ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با پلی‌موفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیرآلوده به عفونت هلیکوباکترپیلوری*

بحث و نتیجه‌گیری

هلیکوباکتر پیلوری در رده اول عوامل عفونی ایجادکننده سرطان دستگاه گوارش قرار دارد (۲۰-۱۸، ۵). نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن سایتوکاین IL-6 در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری با نوع هتروزیگوت (D/G) در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری با نوع هموزیگوت طبیعی (D/D) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، اما ارتباط معنی‌داری در بیان ژن سایتوکاین IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی‌مورفیسم در بیماران آلوده دیده نشد. همچنین نتایج این مطاله نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی‌مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری وجود ندارد. مطالعه Bagheri و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که هیچ ارتباطی بین وجود یا عدم وجود پلی‌مورفیسم در ژن

www.SID.ir

Archive of SID

TLR-4 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری و بیماران غیرآلوده وجود ندارد. اما درجه التهاب مونونوکلئر در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری با ژنوتیپ D/G نسبت به بیماران آلوده با نوع ژنوتیپ D/D به‌طور معنی‌داری بیشتری بود (۱۷). مطالعه Alejandra و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جمعیت بیماران مکزیکی صورت گرفت نشان داد نشان که پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G به میزان ۵۲ درصد در افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری وجود دارد و در این رابطه پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G در بیماران دارای زخم روده و کسانی که مستعد سرطان معده هستند در مقایسه با بیماران دارای التهاب معده غیر آتروفی بیشتر دیده شد. همچنین بیان سایتوکاین‌های IL-1β، IL-8 و GRO-α در افراد آلوده با فرم پلی‌مورفیسم D/G به‌طور معنی نسبت به بیماران با ژنوتیپ D/D پایین‌تر می‌باشد و بیان سایتوکاین‌های TNF-α، IL-10، MCP-1 و MIP-1α در افراد آلوده با پلی‌مورفیسم D/G به‌طور معنی نسبت به بیماران با ژنوتیپ D/D بالاتر می‌باشد (۲۱). در مطالعات بسیاری که اخیراً در کشورهای مختلف بر روی بیماران آلوده هلیکوباکترپیلوری انجام پذیرفته، ارتباط پلی‌مورفیسم ژن TLR-4 را با بیماری‌های معده‌ای-روده‌ای گزارش کرده‌اند. در مطالعه Hellmig S و همکاران نشان داد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 به صورت معنی‌داری در بیماران با لنفومای مخاطی معده نسبت به‌گروه کنترل مبتلا به هلیکوباکترپیلوری به میزان کمتری وجود داشت (۲۲). همچنین مطالعه Hold GL و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 با سرطان معده‌ای غیرکاردیا و شرایط پیش سرطانی این ناحیه ارتباط داشته است (۲۳). در مطالعه Wu MS و همکاران در سال ۲۰۰۶ در چین بر روی بیماران لنفومای اولیه معده و سرطان معده در مقایسه با گروه کنترل نتوانست ارتباطی را در رابطه با ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 در هیچ کدام از ۳ گروه نشان دهد (۲۴). در مطالعه B.R. Achyut و همکاران در سال ۲۰۰۷ در هند نشان داده شد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 در بیماران نسبت به کنترل بیشتر بود و این افراد ۲/۵ برابر ریسک بالاتری برای ابتلا به گاستریت داشته‌اند (۲۵). در مطالعه Garza-Gonzalez1 و همکاران که در سال ۲۰۰۷ در رابطه با ارتباط پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G با سرطان معده صورت گرفت نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ‌های D/D و D/G در بین بیماران دارای سرطان معده و گروه کنترل وجود ندارد (۲۶). همچنین مطالعه Tahara T و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی بیماران ژاپنی دارای سرطان معده صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که ارتباط معنی‌داری بین استعداد ابتلا به سرطان معده و پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (۲۷). مطالعه Kato I و همکاران در سال ۲۰۰۵ که بر روی مراحل مختلف زخم‌های پیش سرطانی معده و پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G در جمعیت ونزولایی صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که ولی ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم TLR-4 D299G و زخم‌های پیش سرطانی وجود ندارد، تنها افزایش خفیف غیرمعنی‌داری در ریسک ابتلا به متاپلازیایی روده‌ای دیده شد که در شرایط D/D، میزان هلیکوباکترپیلوری بافتی بیشتری وجود داشت (۲۸).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پلی مورفیسم نقطه‌ای D299G در ژن TLR-4 باعث افزایش بیان ژن سایتوکاین IL-6 می‌شود و افزایش بیان این سایتوکاین التهابی ممکن است نقش مهمی در ایجاد التهاب معده همراه با

www.SID.ir

Archive of SID

هلیکوباکترپیلوری داشته باشد. بیان بالای ایـن سـایتوکاین ممکن است در تشدید التهاب معده در بیماران آلوده نقـش اصلی داشته باشد. پس به همین دلیل می‌طلبد تـا مطالعـات بیشتری بر روی وجود سلول‌های مختلف سیستم ایمنـی در بیماران آلوده با هلیکوباکترپیلوری در مقایسـه بـا گـروه گنترل انجـام گیـرد تـا نقـش دقیـق ایـن سـلول‌هـا و سایتوکاین‌های که از این سلول‌ها ترشح می‌شوند در بـروز بیماری و در تعیین پیش‌آگهی و ارزیابی برنامه‌های درمانی بیشتر مشخص شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل بخش آندوسکوپی بیمارستان‌هاجر اسـتان چهارمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشـگاه علـوم پزشکی شهرکرد، جهت تأمین بودجه و تصویب این طرح بـا شـماره ۱۵۵٤ و نیز از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Razavi A, Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad M, Rahimian G, Rafieian-Kopaei M, et al. Comparative Immune Response in Children and Adults with H. pylori Infection. *J Immunol Res* 2015; 2015: 315957.
2. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Frequency of virulence factors in Helicobacter pylori-infected patients with gastritis. *Microb pathog* 2015; 80: 67-72.
3. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad M, Zamanzad B, Rahimian G, Taghikhani A, et al. Mucosal interleukin-21 mRNA expression level is high in patients with Helicobacter pylori and is associated with the severity of gastritis. *Cent Eur Immunol* 2015; 40(1): 61-7.
4. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Rahimian G, Razavi A. The biological functions of IL-17 in different clinical expressions of Helicobacter pylori-infection. *Microb Pathogen* 2015; 81: 33-8.
5. Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009; 44(4):239-48.
6. Shirzad H, Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Zamanzad B, Izadpanah E, Abdi M, et al. New insight to IL-23/IL-17 axis in Iranian infected adult patients with gastritis: effects of genes polymorphisms on expression of cytokines. *Acta Gastroenterol Belg* 2015; 78(2):212-8.
7. Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 32552-60.
8. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, et al. Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate

www.SID.ir

Archive of SID

immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2004;72(11): 6446-54.

9. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, et al. Distinct mechanism of Helicobacter pylori-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 44856-64.
10. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(2): 588-93.
11. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135(1): 91-9.
12. Azadegan-Dehkordi F, Bagheri N, Shirzad M, Sanei MH, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Rafieian-Kopaei M, et al. Correlation Between Mucosal IL-6 mRNA Expression Level and Virulence Factors of Helicobacter pylori in Iranian Adult Patients With Chronic Gastritis. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(8): e21701.
13. Bagheri N, Taghikhani A, Rahimian G, Salimzadeh L, Azadegan Dehkordi F, Zandi F, et al. Association between virulence factors of helicobacter pylori and gastric mucosal interleukin-18 mRNA expression in dyspeptic patients. J *Microb Pathogen* 2013; 65: 7-13.
14. Bagheri N, Rahimian G, Salimzadeh L, Taghikhani A, Mahsa M, Hashemzadeh M, et al. Expression of IL-18 cytokine mRNA in gastric mucosa tissue of patients with H. pylori infection in Chahar Mahal and Bakhtiari. *ISMJ* 2014; 17(4): 533-41 [In Persian].
15. Manxhuka-Kerliu S, Telaku S, Devolli-Disha E, Ahmetaj H, Sahatciu-Meka V, Kerliu A, et al. Helicobacter pylori gastritis updated Sydney classification applied in our material. *Macedonian Academy of Sciences and Arts, Section of Biological and Medical Sciences* 2009; 30(1): 45-60.
16. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, Azadegan-Dehkordi F, Taghikhani A, Salimzadeh L, et al. Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF-beta1 mRNA expression in gastritis patients. Microb Pathog 2014; 67-68: 1-7.
17. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Sanei H, Taghikhani A, Rahimian G, Salimzadeh L, et al. Associations of a TLR4 single-nucleotide polymorphism with H. pylori associated gastric diseases in Iranian patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38(3): 366-71.
18. Delport W, Cunningham M, Olivier B, Preisig O, van der Merwe SW. A population genetics pedigree perspective on the transmission of Helicobacter pylori. *Genetics* 2006; 174(4): 2107-18.
19. Zandi F, Shirzad H, Bagheri N, Ahmadi A, Azadegan F, Gharib A, et al. Evaluation of IL-17A and IL-17F genes polymorphism in Iranian dyspeptic

www.SID.ir

Archive of SID

patients. *Life Science Journal* 2013; 10(12s):544-51.

20. Menbari MN, Rahmani SA, Ahmadi A, Zandi F, Bagheri N, Jalili A, et al. Evaluation of E-cadherin (CDH1) gene polymorphism related to gastric cancer in Kurdish population. *Life Science Journal* 2013; 10(12s): 212-6.
21. Trejo-de la OA, Torres J, Perez-Rodriguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, et al. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol* 2008; 129(2): 333-40.
22. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Folsch UR, Hampe J, Schreiber S. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(6): 869-72.
23. Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology* 2007; 132(3): 905-12.
24. Wu MS, Cheng TY, Shun CT, Lin MT, Chen LC, Lin JT. Functional polymorphisms of CD14 and toll-like receptor 4 in Taiwanese Chinese with Helicobacter pylori-related gastric malignancies. *Hepatogastroenterology* 2006; 53(71): 807-10.
25. Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol* 2007; 68(11): 901-7.
26. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007; 7: 70.
27. Tahara T, Shibata T, Hirata I, Nakano H, Arisawa T. CD14 promoter-159 polymorphism is associated with reduced risk of intestinal-type gastric cancer in a Japanese population. *Dig Dis Sci* 2009; 54(7): 1508-12.
28. Kato I, Canzian F, Plummer M, Franceschi S, van Doorn LJ, Vivas J, et al. Polymorphisms in genes related to bacterial lipopolysaccharide/peptidoglycan signaling and gastric precancerous lesions in a population at high risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2007; 52(1): 254-61.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effect of TLR4 Asp299Gly polymorphism on IL-6 and IL -18 expression in H.pylori infected patients

Ghorbanali Rahimian, M.D.[1], Nader Bagheri, Ph.D.[2], Abolfazl Gholipour, Ph.D.[3], Hedayatollah Shirzad, Ph.D. [4*]

1. Assistant Professor, Department of Internal Medicine & Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Ph.D. Student in Immunology, Department of Immunology, School of Public Health & Imonology Research Center, Tehran University of Medical, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Mdicine & Cellular and Molecular Research center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4. Professor, Faculty of Mdicine & Cellular and Molecular Research center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; e-mail: shirzad1951@yahoo.com

(Received: 5 July 2015 Accepted: 29 Dec. 2015)

Abstract

Background & Aims: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is associated with peptic ulcer and gastric cancer. Polymorphisms of the genes coding Toll-like receptors (TLRs) may influence the innate and adaptive immune responses and affect the susceptibility to *H. pylori* or the disease outcomes. But the details and association to different polymorphisms and different clinical expression in patients infected with H. *pylori* have remained unclear. The purpose of this study was to investigate the effect of TLR-4 Asp299Gly polymorphism on expression levels of IL-6 and IL-18 genes in patients infected with *H. Pylori* in comparison to uninfected patients.

Methods: In a case-control study, biopsies were collected from 58 *H. pylori*-infected and 44 uninfected subjects. Genotypes of TLR-4 Asp299Gly single-nuleotide polymorphism were assessed through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The expression levels of mucosal IL-6 and IL-18 mRNA were measured by real time-PCR. Cytokine expression levels in the two groups were analysed using the t test.

Results: The frequencies of D/D and D/G genotypes were respectively 55.2% and 44.8% in *H. pylori*-infected and 77.2% and 22.8% in uninfected subjects. The expression level of IL-6 in *H. pylori* infected patients with TLR-4 gene polymorphism was significantly higher (P=0.001). However, no significant relationship between the expression level of IL-18 and TLR-4 gene polymorphism was reported in patients infected with *H. pylori* (P=0.419). In addition, no significant relationship between IL-6, IL-18 expression levels and TLR-4 gene polymorphism was reported in uninfected patients.

Conclusion: TLR-4 Asp299Gly Gene single-nuclotide polymorphism increases the expression levels of TL-6 and has an important role in development of Hopylori-associated gastrititis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Polymorphism, IL-6, IL-18, TLR-4, Gastritis

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23 (6): 703-713

www.SID.ir