Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Comparing the Expression Levels of mRNA for MMP-7 in Gastric Mucosa of Patients with H. pylori Infection and Uninfected Patients

Marzieh Sadeghiani[1],
Heshmat Shahi[1],
Nader Bagheri[2],
Somayeh Reiisi[3],
Ghorbanali Rahimian[4],
Reza Rashidii[4],
Mohammadhadi Shafigheardestani[4],
Morteza Hashemzadeh Chaleshtori [5],
Mahmoud Rafieian-Kopaei[6],
Ghasem Ramezani[7],
Fereshteh Fatollahi[7],
Elaheh Shahverdi[7],
Hedayatollah Shirzad[5]

[1] MSc in Immunology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[2] PhD Student in Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[5] Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[6] Professor, Medicinal Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[7] BSc in Nursing, Hajar Hospital, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received May 5, 2015 ; Accepted March 9, 2016)

Abstract

Background and purpose: The expression of growth factors, proteolytic enzymes, fibrogenic factors, and cytokines are altered in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infected gastric mucosa. Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of zinc-dependent homologous enzymes digesting most of the components of the extracellular matrix and basement membrane and are involved in remodeling and functioning of the biological processes. The purpose of this study was to compare gene expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in patients with *H. pylori*-infected and uninfected individuals with gastrointestinal diseases.

Materials and methods: This study was conducted in 50 *H. pylori*-negative patients and 50 *H. pylori*-positive patients being admitted to Shahrekord Hajar Hospital due to gastrointestinal diseases in 2014. The participants' demographic information was collected and sampling was done. First DNA was extracted, and then PCR was performed to check for the presence of 16sRNA and UreC. The RNA from each sample was also extracted and cDNA was prepared. Afterwards, the expression of MMP-7 was measured by real time-PCR using specific primers and probes.

Results: MMP-7 mRNA expression was significantly higher in biopsies of *H. pylori*-infected patients compared to that in *H. pylori*-uninfected patients ($P<0.0001$).

Conclusion: Increased expression of MMP-7 can be effective in inflammatory response and development of the disease. It could be used as a key marker for early diagnosis of gastrointestinal diseases and gastric cancer.

Keywords: Helicobacter pylori, matrix metalloproteinase-7, gastrointestinal diseases, Real-Time PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(138): 108-117 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۸ تیر سال ۱۳۹۵ (۱۱۷-۱۰۸)

مقایسه بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۷ دربافت مخاط معده بیماران آلوده به عفونت هلیکوباکترپیلوری و بیماران غیرآلوده

مرضیه صادقیانی[۱]
حشمت شاهی[۱]
نادر باقری[۲]
سمیه رئیسی[۳]
قربانعلی رحیمیان[۴]
رضا رشیدی[۴]
محمدهادی شفیق اردستانی[۴]
مرتضی هاشم زاده چالشتری[۵]
محمود رفیعیان کوپایی[۶]
قاسم رمضانی[۷]
فرشته فتح الهی[۷]
الهه شاهوردی[۷]
هدایت اله شیرزاد[۵]

چکیده

سابقه و هدف: بیان فاکتورهای رشد،آنزیم‌های پروتئولیتیک، فاکتورهای فیبروژنیک و سایتوکاین‌ها می‌توانند باعث ایجاد تغییرات در معده افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری شوند. ماتریکس متالوپروتئینازها از خانواده آنزیم‌های مشابه و وابسته به روی (zn^{2+}) هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشای پایه نقش دارند و از این لحاظ در فرآیندهای بیولوژیکی شرکت دارند. هدف از این مطالعه بررسی تفاوت بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۷ (MMP-7) در بیماران آلوده و غیرآلوده به هلیکوباکتر پیلوری با ناراحتی‌های گوارشی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی از ۵۰ بیمار مثبت و ۵۰ بیمار منفی از لحاظ هلیکوباکترپیلوری که به علت مشکلات گوارشی به بیمارستان هاجر شهر کرد در سال ۱۳۹۳ مراجعه کرده بودند، اطلاعات دموگرافیک جمع آوری و نمونه‌گیری انجام شد.ابتدا از DNA استخراج شده، حضور ژن‌های UreC و16sRNA توسط PCR ارزیابی شد. سطح بیان mRNA مخاطی MMP-7 توسط Real-time PCR با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان نسبی ژن MMP-7 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری به طور معنی‌داری بالاتر از بیماران غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری بود ($p < ۰/۰۰۰۱$).

استنتاج: افزایش بیان MMP-7 ممکن است در پاسخ التهابی و پیشرفت بیماری موثر باشد و شاید بتوان از آن به عنوان یک علامت کلیدی در تشخیص زود هنگام بیماری‌های گوارشی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، ماتریکس متالوپروتئیناز- ۷، بیماری‌های گوارشی، Real time-PCR

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی، عرض ۰/۵ الی ۱ میکرومتر و داشتن ۳ تا ۵ فلاژل قطبی، مارپیچیو میکروآئروفیل با طول ۲/۵ الی ۵ میکرومتر و به شدت متحرک است که به‌خوبی می‌تواند با شرایط

مولف مسئول: هدایت الله شیرزاد- شهرکرد: رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دانشکده پزشکی E-mail:shirzad1951@yahoo.com
۱. کارشناس ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکترای ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. استادیار، گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵. استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۶. استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۷. کارشناس پرستاری، بیمارستان هاجر، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۲/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۲/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدی معده سازگار شود و در این محیط زنده بماند و پاسخ‌های ایمنی طبیعی قادر به حذف آن نمی‌باشد. بر طبق آمار بیش از ۵۰ درصد از جمعیت کشورهای در حال پیشرفت و با شیوع کم‌تر در کشورهای پیشرفته، به این عفونت مبتلا می‌شوند(۳-۱). این آلودگی می‌تواند در بسیاری از موارد بدون علامت (۸۰ درصد) و یا با علائم گاستریت با درجات خفیف تا شدید را ایجاد کند، اما در برخی از افراد می‌تواند بیماری تا مرحله زخم معده پیشروی کندکه خطر سرطان معده در این افراد حداقل ۲ برابر بیش‌تر از افراد غیرآلوده می‌باشد(۴). ابتلا به این باکتری عموماً در دوران کودکی رخ می‌دهد و تا زمانی که با آنتی بیوتیک به‌طور قطعی درمان نشود، پایدار است.آلودگی با این باکتری با پیشرفت بیماری‌های معدی- روده‌ای از جمله گاستریت، زخم پپتیک و سرطان معده در ارتباط است(۵). توانایی بیماریزایی باکتری به عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای ژنتیکی میزبان، شرایط محیطی و فاکتورهای بیماریزای باکتری ارتباط دارد(۷،۶). هلیکوباکترپیلوری در سال ۱۹۹۴ میلادی توسط سازمان بهداشت جهانی در کلاس یک کارسینوژن‌ها قرار گرفته است که آلودگی با آن می‌تواند ابتلا به زخم معده را ۱۰ ۱۰تا ۲۰ درصد و ریسک سرطان‌های پیشرفته معده را ۱ تا ۲ درصد افزایش می‌دهد و در حال حاضر شایع‌ترین عفونت مرتبط با سرطان است و ۵/۵ درصد سرطان‌های دنیا را تشکیل می‌دهد. در حدود ۷۰ درصد از سرطان‌های معده به علت هلیکوباکترپیلوری است که دومین سرطان منجر به مرگ در دنیا است(۴). سرطان معده ناشی از پیشرفت تغییرات مخاطی معده از گاستریت مزمن،آتروفی مخاط معده، متاپلازی روده‌ای، دیسپلازی و در نهایت سرطان می‌باشد. پس سلول‌ها قبل از سرطانی شدن متحمل تغییراتی می‌شوند که با تشخیص زود هنگام آن می‌توان از پیشرفت و حتی سرطان جلوگیری کرد(۸). ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از آنزیم‌های مشابه و وابسته به زینک (Zinc-dependent) هستند که در هضم بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و بافت غشای پایه نقش دارند و از این لحاظ در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله در تکامل جنین، رگ‌زایی، ترمیم زخم و غیره شرکت دارند، هرچند که این فعالیت‌ها موقتی می‌باشند و به‌طور موضعی با مهارکننده‌های درونی کنترل می‌شوند اما در فرآیندهای پاتولوژیکی مثل انواع بیماری‌ها و محرک‌های میکروبی و شیمیایی، پاسخ التهابی با فعال شدن هیستامین‌ها شروع و در نهایت به فعال شدن متالوپروتئینازها منجر می‌شود. در حقیقت بیان بیش از حد و نابه‌جای ماتریکس متالوپروتئینازها با ایجاد و به راه‌اندازی فرآیندهای تخریبی در مواردی از جمله انواع مختلف سرطان‌ها، تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی، التهابات و بیماری‌هایی با حالت تخریبی و پیشرونده در ارتباط است(۹). از جمله در حال حاضر خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها در انسان از ۲۹ اندوپپتیداز خارج سلولی وابسته به روی تشکیل شده است که بیش‌ترین اهمیت را پروتئازها دارند.

ماتریکس متالوپروتئینازها به علت تفاوت در ساختار دومن و سوبستراهای متفاوت در ماتریکس خارج سلولی به شش گروه تقسیم می‌شوند که شامل کلاژنازها، ژلاتینازها، استرومیلایزین‌ها، ماتریلایزن‌ها (شامل MMP-7)، ماتریکس متالوپروتئینازهای غشائی و سایر ماتریکس متالوپروتئینازها می‌باشند(۸،۷).آنزیم MMP-7 کوچک‌ترین ماتریکس متالوپروتئیناز ترشحی با وزن ۳۰ کیلو دالتون است که همانند اکثر ماتریکس متالوپروتئینازها به صورت غیرفعال ترشح می‌شود. با آزاد شدن شکل غیرفعال آنزیم، MMP-7 با وزن ۱۹ کیلودالتون ایجاد می‌شود و قادر به شکستن پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و کلاژن تیپ ۴، الاستین و ژلاتین می‌باشد(۱۰). یافته‌ها حاکی از آن است که MMP-7 در مراحل اولیه سرطان کلون و معده نقش دارد و با تاثیر پروتئولیتیک خود بر ماتریکس خارج سلولی، تهاجم سرطان را افزایش می‌دهد(۱۱). ماتریکس خارج سلولی ساختار اصلی برای حمایت از سلول‌ها و پایداری

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت‌های سلولی را برعهده دارد. رشد سلولی، مهاجرت سلول‌ها و فعالیت‌های دیگری وابسته به بازسازی ماتریکس خارج سلولی است که توسط خود ماتریکس متالوپروتئینازها کنترل می‌شوند(۱۲). آنزیم MMP-7 به طور قابل توجهی در سلول‌های التهابی و اپی‌تلیال راه‌های تنفسی، غدد شیری، معده و دستگاه ادراری- تناسلی افزایش می‌یابد(۱۴،۱۳). هم چنین طبق برخی یافته‌ها از مهم‌ترین شرایط بدخیمی‌هایی از جمله سرطان می‌توان به مهاجرت، جای گیری و رشد سلول سرطانی در داخل بافت میزبان اشاره کرد که نیازمند مراحل پیچیده واکنش‌های سلول سرطانی با بافت میزبان و تغییرات ماتریکس خارج سلولی است(۹). هم‌چنین MMP-7 به طور عمده در سلول‌های اپی‌تلیال مخاطی و گرانولار، کراتینوسیت ها،فیبروبلاست و ماکروفاژها تولید می‌شود و هم‌چنین می‌تواند در سلول‌های توموری بیان شود و از این جهت با سرطان‌ها در ارتباط است. در نتیجه این آنزیم‌ها تاثیر ویژه‌ای در پیشرفت تومورها دارند. در برخی مطالعات افزایش MMP-7 در گاستریت ناشی از هلیکوباکترپیلوری بیان شده است که نشان از مراحل ابتدایی در پیشرفت سرطان‌های معده است(۱۱). برخی مطالعات افزایش سطح MMP-7 در زخم‌های بدخیم معده را نشان داده‌اند(۱۵). مطالعات مختلف این فرضیه را مطرح کردند که ماتریکس متالوپروتئینازها می‌توانند در القای سایتوکاین‌های مختلف و فاکتورهای رشد از جمله لیگاند Fas، TNF-α و کموکاین CXC احتمالاً نقش داشته باشند(۱۶). یکی از علل شایع بیماری‌های گوارشی، عفونت با هلیکوباکتر پیلوری است که در کشور ما شیوع بالای ۷۰ درصد دارد. عدم درمان کامل این عفونت منجر به ایجاد ضایعات پایدار و پیشرونده می‌شود. امروزه به کمک روش‌های مولکولی که از دقت وحساسیت بسیار بالایی برخوردارهستند، می‌توان برای تشخیص هرچه سریع‌تر و جلوگیری از پیشرفت بیماری بهره جست. به نظر می‌رسدکه از اطلاعات به‌دست‌آمده در رابطه با تعیین ارتباط بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در بیماران آلوده به باکتری بتوان در جهت تحقق اهداف فوق استفاده نمود. لذا هدف از این مطالعه بررسی تفاوت بیان ژن MMP-7 در بیماران آلوده و غیرآلوده به هلیکوباکتر پیلوری با ناراحتی‌های گوارشی بوده است.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی بوده است که روی بیماران مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد در سال ۱۳۹۳ انجام شده است و مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد قرار گرفت. بر اساس تشخیص پزشک فوق تخصص گوارش از بیمارانی که مشکلات معدی- روده‌ای داشتند و برای تشخیص بهتر ملزم به انجام آندوسکوپی شده بودند، با کسب رضایت‌نامه کتبی مبنی بر رضایت فرد برای شرکت در این طرح،۲ نمونه از آنتروم با دستگاه آندوسکوپی (Optic Fiber-Japan) توسط پزشک گرفته شد. در کل از ۱۲۰ بیمار بیوپسی جمع‌آوری شده است که از بین آن‌ها ۵۰ نمونه (گاستریت، زخم معده، زخم روده) که از نظر حضور باکتری مثبت بودند، جداسازی شد و هم چنین ۵۰ نمونه از افرادی که بدون عفونت هلیکوباکترپیلوری بودند به عنوان گروه کنترل انتخاب شد. 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 حذف شدند. نمونه‌های بیوپسی گرفته شده فوراً در تانک نیتروژن مایع فریز شدند تا در مراحل بعد RNA آن‌ها استخراج شود. طبق دستورالعمل کیت، استخراج DNA ژنوم باکتری از بافت با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت (Bioflux-Japan) انجام شد. پس از آن حضور ژن‌های UreC و16srRNA به روش PCR در DNA به ترتیب با کمک پرایمرهای اختصاصی تعیین شد(۱۷). تشخیص هلیکوباکترپیلوری براساس تست اوره‌آز سریع، مولکولی

www.SID.ir

Archive of SID

و تهیه لام رنگ‌آمیزی شده از بیوپسی برای تشخیص باکتری در بافت معده انجام شد و التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه‌بندی شدند. بیمارانی که تست‌های اوره‌آز، بررسی مولکولی حضور ژن‌های UreC و 16srRNA و پاتولوژی آن‌ها از لحاظ تشخیص هلیکوباکترپیلوری مثبت بود در گروه افراد آلوده و بیمارانی که هر سه تست در آن‌ها منفی بود در گروه غیرآلوده قرار گرفتند. بیمارانی که یکی از تست‌های نام برده در آن ها مثبت و تست های دیگر منفی بود، در این مطالعه وارد نشدند.

روش PCR برای تشخیص حضور ژن‌های UreC و 16srRNA

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت که در آن ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۰/۲ میکرولیتر از Taq DNA پلیمراز (سیناژن ساخت ایران)، ۱/۵ میکرولیتر از MgCl2 ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر 10X (سیناژن ساخت ایران)، dNTP ۲/۵ میکرومولار به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میلی‌مولار به میزان ۱ میکرولیتر و آب مقطر دوبار یونیزه به میزان ۱۷/۳ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برنامه دمایی و زمان دستگاه به این شرح بود: ابتدا میکروتیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ سیکل، پس ۳۰ قیقه در ۹۵ درجه، پس از آن ۳۰ دقیقه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ دقیقه دیگر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ سیکل قرار گرفتند و در نهایت ۵ قیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ سیکل قرار داده شدند. سپس محصول PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد در جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شدند.

استخراج RNA و تهیه cDNA

به منظور پایدار کردن mRNA یکی از بیوپسی‌ها بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در محلول استخراج Biozol(Bioflux-Japan) 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. استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Nanodrop-American) میزان Total RNA اندازه‌گیری و سپس ۳µl از total RNA با استفاده از کیت evertaid First cDNA synthesis (Fermentase-Finland) طبق روش مندرج در بروشور شرکت سازنده کیت به cDNA تبدیل شد. تمام واکنش‌های real-time PCR در دستگاه Rotor Gene TM 3000 (Corbett-Australia) انجام گردید.

برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول که منجر به واسرشتگی(Denaturation) مولکول‌های cDNA می‌شود، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۴۵ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای جفت شدن (Annealing) و گسترش (Extension) انجام شد. 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 ۰/۲ µl از پروب با غلظت ۱۰ pm، ۱۰µl آب DNase freeRNase/ و ۲µl cDNA به عنوان 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 به عنوان ژن رفرانس در نظرگرفته شد(۲۰-۱۸).

آنالیز داده ها

پس از ثبت اطلاعات مورد نظر از بیماران در فرم‌های مخصوص برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. هم‌چنین جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Graph Pad Prism-5 و t-test استفاده گردید و در نهایت $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

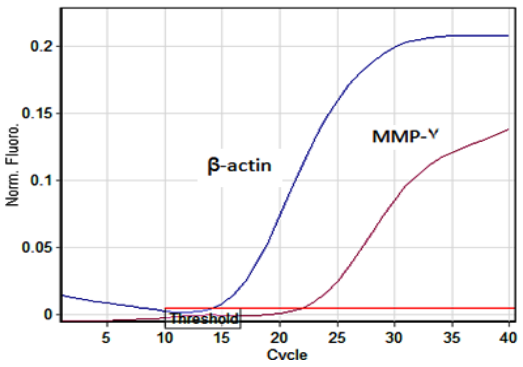
جنسیت بیماران در دو گروه آلوده (۲۷ زن و ۲۳ مرد) و غیرآلوده (۲۸ زن و ۲۲ مرد) در کل شامل ۵۷ بیمار مرد و ۴۳بیمار زن بود. میانگین سن بیماران در گروه آلوده ۲/۱۲± ۴۴/۳ سال و در گروه غیر آلوده ۲/۳۹± ۴۶/۵ سال بود.

پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است.

نمونه‌ای از نتایج real-time PCR در نمودار شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر و پروب های مورد مطالعه

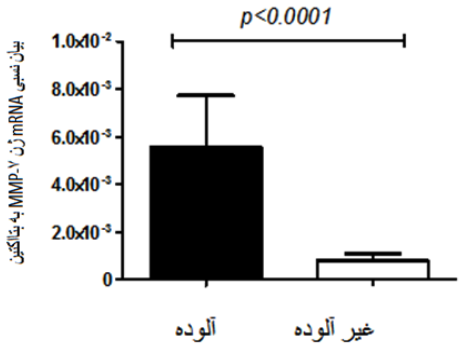
	توالی پرایمرها و پروب ژن بتا اکتین	اندازه محصول (جفت باز)
پرایمر رفت	5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3	
پرایمر برگشت	5-CTGGTGCCTGGGGCG-3	۱۷۴
پروب	FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA	
	توالی پرایمرها و پروب ژن MMP-7	
پرایمر رفت	5- CGGAGGAGATGCTCACTTCG-3	
پرایمر برگشت	5-CAGCATACAGGAAGTTAATCCCTAGA-3	۷۷
پروب	FAM- CTACCATCCGTCCAGCGTTCATCCT-TAMRA	



نمودار شماره ۱: پیشرفت واکنش real time-PCR در بیان ماتریکس متالوپروتئینازمورد مطالعه (این نمودار نمایش سیگنال فلورسنت حاصل از واکنش (محور عمودی) پس از گذشت ۴۰ سیکل (خط افقی، Threshold از واکنش real time-PCR است) را نشان می‌دهد.)

بیان ژن MMP-7 در افراد آلوده و غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری

آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن MMP-7 در افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری و افراد غیرآلوده (p<۰/۰۰۰۱) وجود داشت به‌طوری که میانگین بیان ژن MMP-7 در گروه هلیکوباکترپیلوری مثبت ۰/۰۰۵۵۷۲ و در گروه هلیکوباکترپیلوری منفی ۰/۰۰۰۷۹۶۵ بود پس تفاوت بیان ژن MMP-7 در گروه هلیکوباکترپیلوری مثبت درمقایسه باگروه هلیکوباکترپیلوری منفی ۶/۹۹ برابرشده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: سطح بیان ژنMMP-7 در نمونه بافت بیماران آلوده و غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری

بحث

بر طبق مطالعات انجام شده باکتری هلیکوباکترپیلوری عامل اصلی بیماریهایی معدی-روده‌ای از جمله گاستریت مزمن و زخم‌های گوارشی محسوب می‌شود. این باکتری به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در ایجاد التهاب معده، زخم معده و دئودنوم نام برده می‌شود(۲۲،۲۱،۸). این باکتری 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(۲۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عفونت هلیکوباکترپیلوری با مکانیسم ناشناخته باعث افزایش بیان MMP-1، MMP-2، MMP-3، MMP-7 و MMP-9 می‌شود(۲۷-۲۵). در این مطالعه هدف اصلی بررسی میزان بیان ژن MMP-7 در بیماران آلوده و غیرآلوده به هلیکوباکترپیلوری بوده است که به انواع مختلفی از اختلالات گوارشی مبتلا

www.SID.ir

Archive of SID

بودند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان بیان ژن MMP-7 در گروه بیماران آلوده با اختلالات گوارشی نسبت به بیماران غیرآلوده به نسبت ۶/۹۹ برابر افزایش پیدا کرده است. لذا با توجه به این نتایج شاید بتوان ارتباط بین حضور باکتری و افزایش شدت التهابات را مطرح کرد. نتایج مطالعه حاضر با بسیاری از دیگر محققان هم‌خوانی دارد، هرچند بسیاری از این مطالعات فقط روی سلول‌ها و حیوانات آزمایشگاهی و در محیط *in vitro* است و مطالعه حاضر از جهت بررسی روی بافت بیماران ارزشمند می‌باشد(۲۹،۲۸). مطالعه Crawford و همکاران که روی سلول‌های (Humanm gastric carcinoa cell) AGS صورت گرفت، نشان داد که گونه‌های دیگر هلیکوباکترپیلوری از جمله هلیکوباکترژژونی و باکتری اشرشیا کلی قادر به القای تولید MMP-7 نبوده و این ویژگی فقط از خصوصیات هلیکوباکترپیلوری می‌باشد(۳۰). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بیان MMP-7 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری نسبت به افراد غیرآلوده به طور معنی‌داری افزایش می یابد و فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکترپیلوری که اختصاصی این باکتری می‌باشند، ممکن است در القای تولید MMP-7 نقش داشته باشند(۳۰،۳۱). مطالعه Chung و همکاران نشان داد که بیان MMP-7 در بیماران دارای سرطان معده در مقایسه با بیماران دارای دیسپلازی معده به‌طور چشم‌گیری بالا می‌باشند. نتایج این گروه از محققین نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری در بیان MMP-7 درگروه بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری با سرطان معده در مقایسه با گروه بیماران غیرآلوده و دارای سرطان معده وجود ندارد. هم‌چنین بیان MMP-7 در بیماران دارای سرطان معده در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری با زخم‌های گوارشی و بیماران آلوده و فاقد زخم گوارشی به طور معنی‌داری بالاتر می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که خود هلیکوباکترپیلوری یا فاکتورهای بیماریزایی این عامل عفونی می‌توانند نقش مهمی در تغییرات اولیه در ایجاد سرطان معده داشته باشند(۱۱). در مطالعه Rautelin و همکاران نشان داده شده که بیان MMP-7 در سلول‌های آلوده به هلیکوباکترپیلوری و مخاط معده افراد آلوده به عفونت افزایش می‌یابد. هم‌چنین افزایش بیان MMP-7 باعث فعال شدن MMP-8 می‌شود. اگرچه نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان سطح سرمی MMP-7 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری در مقایسه با افراد غیرآلوده دیده نمی‌شود(۳۲).

مطالعه Krakowiak و همکاران نشان داد که موش‌های فاقد ژن $MMP\text{-}7^{-/-}$ در پاسخ به عفونت هلیکوباکترپیلوری آسیب و التهاب شدیدتر نسبت به عفونت هلیکوباکترپیلوری دارند که این حالت احتمالاً در اثر مهار کردن تجمع ماکروفاژهای سیستم ایمنی بدن توسط MMP-7 ایجاد می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که بیانMMP-7 نقش مهمی در محدودکردن آسیب‌های ایجاد شده توسط عفونت هیکوباکترپیلوری که ممکن است باعث ایجاد عفونت مزمن شود، را داشته باشد(۹).

مطالعه Caruso و همکاران نشان داد که IL-21در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و سلول‌های اپی‌تلیال معده در پاسخ به IL-21 باعث افزایش بیان MMP-2 و MMP-9 می‌شوند اما تاثیری در بیان MMP-7 ندارد(۳۳).

یکی از علل شایع بیماری‌های گوارشی، عفونت با هلیکوباکترپیلوری است که در جوامع امروزی شیوع بالایی نیز دارد. عدم درمان کامل این عفونت منجر به ایجاد ضایعات پایدار و پیشرونده می‌شود که سبب ایجاد التهاب و افزایش سایتوکاین‌ها و ماتریکس متالوپروتئینازهای التهابی می‌شود. عفونت‌های پایدار نیز در طی سال‌های متمادی می‌تواند افراد را به سمت سرطان‌های گوارشی سوق دهد لذا با درمان به موقع که سبب کاهش سایتوکاین‌ها و ماتریکس متالوپروتئینازهای التهابی می‌شود و هم‌چنین کنترل و پیشگیری از پیشرفت ضایعات، از آسیب‌های شدیدتر جلوگیری شده و احتمال سرطان‌های گوارشی کاهش می‌یابد(۳۴). در برخی

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات ارتباط بین فاکتورهای مختلف بیماریزای باکتری و افزایش برخی ازماتریکس متالوپروتئینازها و سایتوکاین‌های التهابی را مطرح کرده‌اند(۴). لذا پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات بیش‌تر و تعیین این ارتباطات بتوان در تشخیص به موقع و پیشگیری از صدمات بیش‌تر مالی و جانی برای بیماران، گام بلندی را در کاهش و درمان به موقع بیماران انجام داد. این مطالعه از این روکه برای اولین بار در کشور صورت گرفته است و از این جهت که طبق یافته‌ها شاید بتوان افزایش معنادار بیان MMP-7 را در افراد آلوده به هلیکوباکترپیلوری به عنوان یک عامل کلیدی مرتبط با پیشرفت و پیش‌آگهی بد بیماری‌های گوارشی دانست، ارزشمند است. لذا این مسائل ارزش تشخیص سریع و پیشگیری از وخیم‌تر شدن بیماری را با به کارگیری روش‌های نوین پررنگ‌تر می‌کند.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مؤلف با کد ۱۷۸ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی به انجام شده است و نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت و مرکز تحقیقاتی و هم‌چنین پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر و تمام عزیزانی که به نحوی در اجرای این پروژه همکاری کردند، اعلام می‌دارند.

References

1. 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 Pthog 2015; 81: 33-38.
2. 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.
3. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Rafieian-Kopaei M, Kheiri S, et al. Altered Th17 Cytokine Expression in Helicobacter pylori Patients with TLR4 (D299G) Polymorphism. Immunol Invest 2016; 45(2): 1-11.
4. Miernyk K, Morris J, Bruden D, McMahon B, Hurlburt D, Sacco F, et al. Characterization of Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes among Alaskans and their correlation with clinical disease. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3114-3121.
5. 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.
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): 212-218.
7. Shahi H, Moghni M, Shirzad H. The relation between severe density of Helicobacter pylori in biopsy with cigarette smoking and age in infected patients. Iranian Journal of Medical Microbiology 2015; 9(1): 1-5.
8. D'Elios MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for Helicobacter pylori. Helicobacter 2014; 19(Suppl 1): 19-26.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Krakowiak MS, Noto JM, Piazuelo MB, Hardbower DM, Romero-Gallo J, Delgado A, et al. Matrix metalloproteinase 7 restrains Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. Oncogene 2015; 34(14): 1865-1871.
10. Yeh SI, Han KY, Sabri A, Rosenblatt MI, Azar DT, Jain S, et al. MMP-7 knock-in corneal fibroblast cell lines secrete MMP-7 with proteolytic activity towards collagen XVIII. Curr Eye Res 2010; 35(9): 799-805.
11. Chung WC, Jung SH, Lee KM, Paik CN, Kawk JW, Jung JH, et al. The detection of Helicobacter pylori cag pathogenicity islands (PAIs) and expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in gastric epithelial dysplasia and intramucosal cancer. Gastric Cancer 2010; 13(3): 162-169.
12. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Int J Biochem Cell Biol 2008; 40(6-7): 1362-1378.
13. Vargo-Gogola T, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. Cancer Res 2002; 62(19): 5559-5563.
14. Lopez-Boado YS, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ, Parks WC. Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. J Cell Biol 2000; 148(6): 1305-1315.
15. Aihara R, Mochiki E, Nakabayashi T, Akazawa K, Asao T, Kuwano H. Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. Br J Surg 2005; 92(4): 454-462.
16. McCaig C, Duval C, Hemers E, Steele I, Pritchard DM, Przemeck S, et al. The role of matrix metalloproteinase-7 in redefining the gastric microenvironment in response to Helicobacter pylori. Gastroenterology 2006; 130(6): 1754-1763.
17. 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. Microbial Pathogenesis 2015; 80: 67-72.
18. 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): 61-67.
19. 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. Microb Pathog 2013; 65: 7-13.
20. Bagheri N, Rahimian G, Salimzadeh L, Azadegan F, Rafieian-Kopaei M, Taghikhani A, et al. Association of the virulence factors of Helicobacter pylori and gastric mucosal interleukin-17/23 mRNA expression in dyspeptic patients. EXCLI J 2013; 12: 5-14.
21. 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.
22. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Sanei H, Taghikhani A, Rahimian G, Salimzadeh L, et al. Associations of a TLR4 single-nucleotide

www.SID.ir

Archive of SID

polymorphism with H. pylori associated gastric diseases in Iranian patients. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2014; 38(3): 366-371.

23. Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol 2009; 44(4): 239-248.
24. 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): 2107-2118.
25. Gooz M, Shaker M, Gooz P, Smolka AJ. Interleukin 1beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during Helicobacter pylori infection. Gut 2003; 52(9): 1250-1256.
26. Krueger S, Hundertmark T, Kalinski T, Peitz U, Wex T, Malfertheiner P, et al. Helicobacter pylori encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK. J Biol Chem 2006; 281(5): 2868-2875.
27. Bergin PJ, Sicheng W, Qiang PH, Marianne QJ. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by macrophages, in vitro, in response to Helicobacter pylori. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45(2): 159-169.
28. Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ, Aviles F, Collins HM, Watson SA, et al. Helicobacter pylori upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells in vivo and in vitro in a Cag dependent manner. Gut 2003; 52(10): 1408-1413.
29. Sier CF, Hawinkels LJ, Zijlmans HJ, Zuidwijk K, de Jonge-Muller ES, Ferreira V, et al. Endothelium specific matrilysin (MMP-7) expression in human cancers. Matrix Biol 2008; 27(3): 267-271.
30. Crawford HC, Krishna US, Israel DA, Matrisian LM, Washington MK, Peek RM, Jr. Helicobacter pylori strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. Gastroenterology 2003; 125(4): 1125-1136.
31. Ogden SR, Wroblewski LE, Weydig C, Romero-Gallo J, O'Brien DP, Israel DA, et al. p120 and Kaiso regulate Helicobacter pylori-induced expression of matrix metalloproteinase-7. Mol Biol Cell 2008; 19(10): 4110-4121.
32. Rautelin HI, Oksanen AM, Veijola LI, Sipponen PI, Tervahartiala TI, Sorsa TA, et al. Enhanced systemic matrix metalloproteinase response in Helicobacter pylori gastritis. Ann Med 2009; 41(3): 208-215.
33. Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathology. World J Gastroenterol (WJG) 2007; 13(42): 5547-5551.
34. Krakowiak M, Noto J, Piazuelo M, Hardbower D, Romero-Gallo J, Delgado A, et al. Matrix metalloproteinase 7 restrains Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. Oncogene 2015; 34(14): 1865-1871.

www.SID.ir