ORIGINAL ARTICLE

Association of LGR5 Expression with Gastric Cancer and Helicobacter pylori CagA Genotype

Fatemeh Montazer[1],
Hossein Lamsehchi[2],
Reza Valadan[3],
Akbar Hedayatizadeh-Omran[4],
Mohammad Eslamijouybari[5],
Ghasem Janbabai[6],
Omolbanin Amjadi[7],
Mohadeseh Ahmadi[8],
Reza Alizadeh-Navaei[9]

[1] Assistant Professor, Department of Pathology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] General Practitioner, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4]Associate Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute ,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Professor, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7] MSc in Molecular and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[8] MSc in Biotechnology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[9]Assistant Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 3, 2021 ; Accepted April 12, 2021)

Abstract

Background and purpose: Given the role of cancer stem cells in cancer, the aim of this study was to determine the expression of LGR5 marker in gastric cancer and its association with cagA genotype of *Helicobacter pylori* infection.

Materials and methods: A case-control study was performed in gastric biopsy specimens from antrum and body during endoscopic examination of patients attending Sari Touba Clinic, 2017-2018. After reviewing the patient records, the samples from those aged 50 and higher were studied. Case group included gastric cancer specimens with *H. pylori* infection (n=30) and control group included non-cancerous samples with *H. pylori* infection (n=30). LGR5 expression and presence of cagA were evaluated by IHC and PCR methods, respectively.

Results: The mean ages of gastric cancer and control group were 69.5±10.1 and 62.3±7.8, respectively (P= 0.003). Twenty three patients (76.7%) in cancer group and 24 patients (80%) in control group were positive for cagA genotype. Overexpression of LGR5 was observed in 15 patients (51.7%) with gastric cancer and 11 patients (39.3%) in control group (P= 0.429). LGR5 was also overexpressed in 18 cases (40.9%) with cagA positive genotype and 8 cases (61.5%) with negative cagA genotype (P=0.22).

Conclusion: High expression of LGR5 was observed in half of patients with gastric cancer but it was not significantly associated with cagA *H.pylori* genotype.

Keywords: gastric cancer, *Helicobacter pylori,* LGR5

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (197): 93-100 (Persian).

*** Corresponding Author: Reza Alizadeh-Navaei -** Gastrointestinal Cancer Research Center, Non-communicable Diseases Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: reza_nava@yahoo.com)

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره ۱۹۷ خرداد سال ۱۴۰۰ (۱۰۰-۹۳)

بررسی ارتباط بین بیان LGR5 با سرطان معده و ژنوتیپ Cag A عفونت *هلیکوباکترپیلوری*

فاطمه منتظر [۱]
حسین لمسه‌چی [۲]
رضا ولدان [۳]
اکبر هدایتی‌زاده عمران [۴]
محمد اسلامی جویباری [۵]
قاسم جان بابایی [۶]
ام البنین امجدی [۷]
محدثه احمدی [۸]
رضا علیزاده نوائی [۹]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نقش مطرح شده برای سلول‌های بنیادی سرطان در ایجاد سرطان، هدف از این مطالعه تعیین بیان مارکر LGR5 در سرطان معده و ارتباط آن با ژنوتیپ Cag A عفونت *هلیکوباکترپیلوری* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی بر روی نمونه‌های بیوپسی معده بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک تخصصی طوبی در بازه زمانی سال ۹۷-۹۶ انجام گرفت. پس از بررسی پرونده‌های بیماران، افرادی که سن بیش از ۵۰ سال داشتند وارد مطالعه شدند. گروه مورد شامل نمونه‌های بافت سرطان معده همراه با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* (۳۰ نفر) و گروه کنترل نمونه‌های بافت غیر مبتلا همراه با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* (۳۰ نفر) بودند. وضعیت بیان مارکر LGR5 توسط روش IHC و ژنوتیپ cagA توسط روش PCR تعیین شد.

یافته‌ها: میانگین سنی در دو گروه مبتلا به سرطان و گروه کنترل به ترتیب ۱۰/۱±۶۹/۵ و ۷/۸±۶۲/۳سال بود (P=۰/۰۰۳). ۲۳ نفر (۷۶/۷ درصد) در گروه مبتلا به سرطان و ۲۴ نفر (۸۰ درصد) در گروه کنترل از نظر ژنوتیپ cagA مثبت بودند. بیان بالای مارکر LGR5 در ۱۵ نفر (۵۱/۷ درصد) از بیماران مبتلا به سرطان معده و در ۱۱ نفر (۳۹/۳ درصد) از افراد گروه کنترل مشاهده شد (P=۰/۴۲۹). همچنین بیان بالای این مارکر در ۱۸ مورد (۴۰/۹ درصد) افراد با ژنوتیپ cagA مثبت و ۸ مورد (۶۱/۵ درصد) افراد با ژنوتیپ cagA منفی دیده شد (P=۰/۲۲).

استنتاج: بیان بالای مارکر LGR5 در نیمی از بیماران مبتلا به سرطان معده مشاهده شد و ارتباط معنی‌داری با ژنوتیپ cagA *هلیکوباکترپیلوری* یافت نشد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، *هلیکوباکترپیلوری*، LGR5

مقدمه

سرطان یکی از مشکلات سلامتی انسان است که سالیانه سبب میلیون‌ها مرگ می‌شود که در این بین سرطان‌های گوارشی از شیوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشند(۱). مدارک و شواهد نشان می‌دهد که اکثر، نه همه، بدخیمی‌ها از سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده‌اند(۲).

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۰۹۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.
مولف مسئول: رضا علیزاده نوایی- ساری: میدان معلم، معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران E-mail: reza_nava@yahoo.com
۱ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماریهای غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استاد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۷. کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۹. استادیار، مرکز تحقیقات سرطان های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۹/۱۲/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۹/۱/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۴۰۰/۱/۲۳

Cancer Stem Cell (CSC) زیرگروهی از سلول‌های تومورال بوده که خصوصیت سلول‌های بنیادی یعنی توانایی self-renewal (خودنوسازی) و تمایز را داشته، که ابتدا در بدخیمی‌های خونی و سپس برای بسیاری از تومورهای توپر از جمله سرطان های گوارشی گزارش گردید(۴،۳). به‌نظر می‌رسد مقاومت به درمان‌های رایج سرطان و عود مجدد تومور مربوط به مقاومت انتخابی سلول های بنیادی سرطان باشد(۵).

LGR5 [1] از خانواده G-protein coupled receptor بوده که در سال ۲۰۰۷ بع‌عنوان ماکر سلول بنیادی سرطان شناخته شده است. این پروتئین مسیر سیگنالینگ Wnt را فعال می‌کند(۷،۶). این مارکر نقش مهمی در کانسرهای گوارشی داشته و در پروگنوز بیماری نیز نقش تعیین‌کننده دارد و بعنوان یک مارکر بالقوه برای هدف‌گذاری درمانی پیشنهاد شده است(۸) و مطالعات مختلف نشان داده اند که میزان بیان آن در بافت‌های کانسری اولیه کولون و معده و متاستازهای این کانسرها چندین برابر بافت‌های غیرکانسری می‌باشد(۱۳-۹). فرضیه‌های مختلفی از جمله جهش سلول بنیادی نرمال روده‌ای(۱۵،۱۴)، برنامه‌نویسی مجدد سلول‌های اپی‌تلیال تمایز یافته(۱۷،۱۶) و تمایز سلول برگرفته از مغز استخوان(۱۹،۱۸) به‌عنوان منشا سلول‌های بنیادی روده مطرح شده‌اند و فاکتورهای اپی‌ژنتیک از جمله *هلیکوباکترپیلوری* (*H.pylori*) نیز به‌عنوان عوامل احتمالی ایجادکننده سلول‌های بنیادی سرطان مطرح می‌باشند(۲۱،۲۰). *هلیکوباکترپیلوری* یک پاتوژن باکتریایی معده است که دارای دو نوع CagA [2] مثبت و منفی می‌باشد و از نظر اتیولوژیکی نوع CagA مثبت بیش‌تر با سرطان معده در ارتباط است. ژن CagA یک انکوپروتئین بوده که بعد از انتقال به سلول‌های اپی‌تلیال معده از طریق مسیرهای سیگنالینگ متعددی می‌تواند سبب القای بدخیمی شود(۲۱). با توجه به این‌که مطالعات انجام شده نقش ژنوتیپ *هلیکوباکترپیلوری* را مورد بررسی قرار نداده‌اند و همچنین با در نظر گرفتن اهمیت سلول‌های بنیادی سرطان و با توجه به تفاوت‌های ژنتیکی و نژادی در بروز سرطان، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بیان مارکر LGR5 با سرطان معده و عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در استان مازندران بعنوان یکی از مناطق با میزان بالای سرطان معده انجام شد.

مواد و روش ها

مطالعه مورد- شاهدی حاضر با کد اخلاق IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1396.3099 بر روی نمونه‌های بیوپسی معده از دیواره‌های آنتروم و بادی، طی بررسی آندوسکوپیک از بیماران مراجعه کننده به یک کلینیک تخصصی در شمال ایران (کلینیک طوبی) در بازه زمانی سال ۹۷-۹۶ انجام گرفت. پس از بررسی پرونده‌های بیماران، افرادی که سن بیش از ۵۰ سال داشتند وارد مطالعه شدند. گروه مورد شامل نمونه‌های بیماران آدنوکارسینوم اولسراتیو معده همراه با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* و گروه کنترل شامل گاستریت مزمن فعال خفیف بود. در گروه کنترل، بیماران دچار متاپلازی، دیسپلازی و زخم پپتیک از مطالعه خارج شدند. تشخیص نمونه سرطانی و وضعیت آلودگی به عفونت هلیکوباکتر با رنگ‌آمیزی گیمسا بر اساس گزارش پاتولوژی بود. در مطالعه حاضر وضعیت بیان LGR5 توسط روش ایمونوهیستوشیمی بررسی و برای تعیین نوع ژنوتیپ *هلیکوباکترپیلوری* نیز PCR انجام شد. جهت استخراج DNA، بلوک‌های پارافینه به ضخامت ۵ الی ۸ میکرون برش داده شد و توسط کیت استخراج DNA از بافت پارافینه شرکت کیاژن طبق پروتکل کیت استخراج شد. ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16SrRNA مختص گونه هلیکوباکتر، هویت سویه مشخص شده(۲۲) به منظور تشخیص ژن Cag A

1. leucine-rich-repeat containing G-protein-coupled receptor 5
2. Cytotoxin-associated gene A

هلیکوباکترپیلوری از تکنیک Nested PCR استفاده گردید. پرایمرهای مرحله اول PCR و Nested PCR (جدول شماره ۱) با استفاده از برنامه Allele ID(7.5) طراحی شدند. سایز مورد انتظار برای محصول نهایی ۱۱۷ جفت باز بوده است. برای کنترل کیفیت واکنش‌های PCR، کنترل مثبت و منفی نیز استفاده شد.

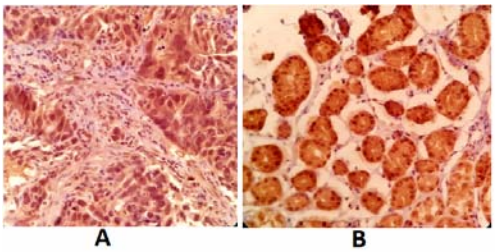
برای بررسی بیان مارکر LGR5 توسط روش ایمونوهیستوشیمی، برش‌هایی به ضخامت ۴ الی ۵ میکرون از بلوک‌های پارافینه تهیه شد که بعد از مراحل پارافین زدایی و AntigenRetrieval و Blocking از کیت‌های تشخیصی آنتی‌بادی مونوکلونال سیگما که به نسبت ۱ به ۲۰۰ توسط diluent Antibody رقیق شده بود، استفاده شد. بروز غشایی مارکر LGR5 به‌صورت رنگ بنفش در بافت‌ها بصورت نیمه کمی یعنی نسبت سلول‌های تومورال مثبت به همه سلول‌های تومورال مورد بررسی قرار گرفت و بیان بالای ۲۵ درصد بعنوان بیان بالا درنظر گرفته شد.

در نهایت داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و تست آماری t-test و Chi-square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری P <۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

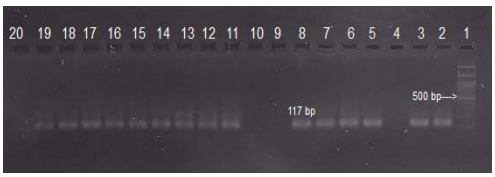
این مطالعه بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان معده که *هلیکوباکترپیلوری* مثبت بودند و ۳۰ فرد غیرمبتلا به سرطان که *هلیکوباکترپیلوری* مثبت بودند، انجام شد. میانگین سنی در دو گروه مبتلا به سرطان و گروه کنترل به ترتیب ۱۰/۱±۶۹/۵ و ۷/۸±۶۲/۳ سال بود (P=۰/۰۰۳). همان‌طورکه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است توزیع جنسی نمونه‌ها و محل گرفتن بیوپسی در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین ۲۳ نفر (۷۶/۷ درصد) در گروه مبتلا به سرطان و ۲۴ نفر (۸۰ درصد) در گروه کنترل از نظر ژنوتیپ cagA مثبت بودند (P=۱).

بیان مارکر LGR5 با روش ایمونوهیستوشیمی در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. بیان بالای مارکر LGR5 در ۱۵ نفر (۵۱/۷ درصد) از بیماران مبتلا به سرطان معده و ۱۱ نفر (۳۹/۳ درصد) از افراد گروه کنترل مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری نداشت (P=۰/۴۲۹) (جدول شماره ۳).



تصویر شماره ۱: نمای IHC مارکر LGR5 در سلول‌های سرطانی (A) و نرمال (B) با بزرگنمایی ۴۰۰×

نتایج الکتروفرز محصولات PCR برخی از نمونه‌ها جهت شناسایی ژن Cag A *هلیکوباکترپیلوری* در تصویر شماره۲ نشان داده شده است که ستون یک Ladder می‌باشد. در سایر ستون ها محصول ۱۱۷ جفت بازی موارد cag A مثبت را نشان می‌دهد که ستون ۴، ۹، ۱۰ و ۲۰ برای cag A منفی سایر موارد مثبت بودند. همچنین بیان بالای LGR5 در ۱۸ مورد (۴۰/۹ درصد) افراد با ژنوتیپ cagA مثبت و در ۸ مورد (۶۱/۵ درصد) افراد با ژنوتیپ cagA منفی دیده شد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود (P=۰/۲۲) (جدول شماره ۳).



تصویر شماره ۲: نتایج الکتروفرز PCR برخی از نمونه ها

جدول شماره ۱: توالی پرایمر و شرایط PCR برای تشخیص *هلیکوباکترپیلوری* در نمونه های بافت پارافینه

نام ژن	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size	PCR condition
Cag A Single-Step PCR	*Cag A* F	GCTCGTGAATGATAAGATAGTT	۲۰۸	35 cycles of 94^{0}C for 30 sec, 56^{0}C for 30 sec and 72^{0}C for 30 sec
	Cag A R	CGC CAA GCA GTA ATA TCC		
Cag A Nested PCR	*Cag A* F	GAT TAT TCT GAT TCG TTC AAG TT	۱۱۷	
	Cag A R	CGC CAA GCA GTA ATA TCC		

جدول شماره ۲: خصوصیات پایه نمونه‌های مورد بررسی در دو گروه مبتلا به سرطان معده و گروه کنترل

	کنترل (۳۰ نفر) تعداد (درصد)	سرطان معده (۳۰ نفر) تعداد (درصد)	سطح معنی داری
سن			
۵۰ تا ۶۰	۱۳ (۴۳/۳)	۷ (۲۳/۳)	
۶۱ تا ۷۰	۱۲ (۴۰)	۷ (۲۳/۳)	۰/۰۳
۷۱ تا ۸۰	۴ (۱۳/۳)	۱۲ (۴۰)	
۸۱ تا ۹۰	۱ (۳/۳)	۴ (۱۳/۳)	
جنس			
زن	۱۵ (۵۰)	۹ (۳۰)	۰/۱۸۷
مرد	۱۵ (۵۰)	۲۱ (۳۰)	
محل نمونه			
آنتروم	۱۴ (۴۶/۷)	۹ (۳۰)	
تنه	۳۰ (۹)	۸ (۲۶/۷)	۰/۳۷
آنتروم و تنه	۲۰ (۶)	۱۲ (۴۰)	
فوندوس	۱ (۳/۳)	۱ (۳/۳)	
Cag A			
منفی	۶ (۲۰)	۷ (۲۳/۳)	۱
مثبت	۲۴ (۸۰)	۲۳ (۷۶/۷)	

جدول شماره ۳: بررسی میزان بیان مارکر LGR5 دربین افراد مورد بررسی

متغیر	Low LGR5 تعداد (درصد)	High LGR5 تعداد (درصد)	سطح معنی داری
گروه			
سرطان معده	۱۴ (۴۸/۳)	۱۵ (۵۱/۷)	۰/۴۲۹
کنترل	۱۷ (۶۰/۷)	۱۱ (۳۹/۳)	
ژنوتیپ cagA			
مثبت	۲۶ (۵۹/۱)	۱۸ (۴۰/۹)	۰/۲۲
منفی	۵ (۳۵/۸)	۸ (۶۱/۵)	

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان بالای مارکر LGR5 در نیمی (۵۱/۷ درصد) از گروه مبتلا به سرطان معده دیده شد. در مطالعه‌ای که توسط Bu و همکاران منتشر شده بود میزان وجود LGR5 در مرحله یک و دو کانسر معده ۵۱/۸ درصد گزارش شد(۱۰) و یا در مطالعه‌ای که توسط Simon و همکاران انجام گرفته میزان بیان Lgr5 در بافت‌های سرطانی حدود ۸۱ درصد بوده است. این میزان در سلول‌های استرومال سرطانی حدود ۶۳ درصد بوده است(۱۲) که این تفاوت در مطالعات مختلف می‌تواند بخاطر تفاوت‌های نژادی و تفاوت‌های ویژگی نمونه‌ها و نیز روش‌های بررسی بیان باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد نسبت بیان بالای مارکر LGR5 در گروه مبتلا به سرطان معده بالاتر از گروه کنترل بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مطالعه‌ای که توسط Uehara و همکاران در سال ۲۰۱۳، در مورد آسیب وارده به DNA توسط *هلیکوباکترپیلوری* در سلول‌های LGR5 مثبت در افراد مبتلا به سرطان معده توسط روش ایمونوهیستوشیمی انجام شده بود، متوسط تعداد سلول‌های LGR5 مثبت در افراد مبتلا به سرطان معده و *هلیکوباکترپیلوری* مثبت ۱۱/۷±۸/۱ و در افراد نرمال (غیر مبتلا به سرطان معده) و *هلیکوباکترپیلوری* مثبت ۱۲/۳±۳/۷ بود(۲۳)، که این مقدار نیز از نظر آماری معنی‌دارد نبود و مشابه نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. با این حال در اکثر مطالعات انجام شده حاکی از بیان افزایش یافته این مارکر در سرطان در مقایسه با نمونه‌های غیر مبتلا می‌باشد. به طوری‌که در مطالعه‌ای که توسط Yamanoi و همکاران انجام شد میزان بیان LGR5 در بافت کانسری معده ۵ برابر بیش‌تر از بافت نرمال بود(۹) و یا در مطالعه‌ای که توسط Simon و همکاران انجام گرفته میزان بیان Lgr5 در بافت‌های سرطانی (۸۱ درصد) بیش‌تر از بافت‌های غیرسرطانی بوده است(۱۲). این تفاوت بین مطالعه حاضر و سایر مطالعات انجام شده احتمالاً بخاطر تفاوت در جامعه مورد مطالعه باشد، به‌طوری‌که در مطالعه حاضر و نیز مطالعه Uehara تمام نمونه‌های مورد بررسی چه در گروه بیماران و چه در گروه کنترل *H.pylori* مثبت بودند. با این حال در یک مطالعه حیوانی که توسط

Levi و همکاران انجام گرفته بود، گزارش شد که مارکرهای سلول‌های بنیادی سرطان از قبیل ALDH1، LGR5 و CD166 در مخاط معده موش جوان بیان پایینی دارند. در مقابل، سطح بیان برای هر سه شاخص به طور قابل توجهی در آدنوکارسینوم معده بالاتر بود(۲۴) و یا در مطالعه Wang و همکاران در خصوص تنظیم تکثیر سلول‌های آدنوکارسیونم معده توسط LGR5 از طریق فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt ، نشان داده شد که ناک داون کردن LGR5 یا سرکوب مسیر پیام‌رسانی Wnt توسط مهارکننده C59 باعث توقف تزاید سلولی و تهاجم سرطان معده می‌گردد(۲۵).

نتایج مطالعه حاضر و بررسی نمونه‌های توسط PCR برای بررسی ژنوتیپ *هلیکوباکترپیلوری* نشان داد بیان بالای LGR5 اختلاف معنی‌داری بین افراد با ژنوتیپ cagA مثبت و منفی وجود نداشت. در مطالعه Bessède و همکاران که با هدف تعیین نقش *هلیکوباکترپیلوری* در تبدیل اپی تلیومی- مزانشیمی و در ظهور سلول‌های بنیادی سرطانی معده در محیط آزمایشگاه انجام شده بود، بیان شد که *H.pylori* از طریق ژن cagA، سبب افزایش بیان CD44، که یک مارکر سلول بنیادی سرطان می‌باشد، شده است(۲۶) که برای تعیین دقیق نقش ژن cagA نیاز به مطالعات بیش‌تر با حجم نمونه بالاتر می‌باشد.

حجم نمونه نسبتا پایین از جمله محدودیت‌های این مطالعه بود و از نقاط قوت مطالعه حاضر انتخاب نمونه‌ای بود که مبتلا به سرطان نبودند، در حالی که در سایر مطالعات از بافت سالم بیماران سرطانی بعنوان گروه کنترل استفاده می‌شود، از طرفی خود گاستریت هم شاید بر بیان LGR5 اثرگذار باشد. همچنین نقطه قوت دیگر مطالعه این بود که برای اولین بار نقش ژنوتیپ *H.pylori* یعنی cagA را مورد بررسی قرار داد.

براساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه بیان بالای مارکر LGR5 در نیمی از بیماران مبتلا به سرطان معده مشاهده شد، ولی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. از طرفی دیگر ارتباط معنی‌داری بین بیان بالای مارکر LGR5 با ژنوتیپ *H.pylori* مشاهده نشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد ۳۰۹۹ انجام شده است.

References

1. Hedayatizadeh-Omran A, Yaghoubi-Ashrafi M, Qazizadeh Z, Mousavi RS, Shekarriz R, Eslami M, et al. Epidemiology of gastrointestinal cancers in the north of iran: Results of mazandaran population-based cancer registry. Turk J Onkol 2020; 35(4): 414-421.
2. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008; 8(10): 755-768.
3. Sanders MA, Majumdar AP. Colon cancer stem cell: implication in carcinogenesis. Front Biosci 2011; 16: 1651-1662.
4. Wilson BJ, Schattan T, Frank MH, Frank NY. Colorectal cancer stem cell: Biology and therapeutic implications. Curr Colorectal Cancer Rep 2011; 7(2): 128-135.
5. Choi D, Won lee H, Yol hur K, Joon kim J, Sin park G, Hyong jang S, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. World J Gasteroentrol 2009; 15(18): 2258-2264.
6. Becker L, Huang Q, Mashimo H. Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal

tissue. Scientific World Journal 2008; 8: 1168-1176.

7. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 2007; 449(7165): 1003-1007.
8. Wu XS, Xi HQ, Chen L. Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival .World J Surg Oncol 2012; 10: 244.
9. Yamanoi K, Fukuma M, Uchida H, Kushima R, Yamazaki K, Katai H, et al. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. Pathol Int 2013; 63(1): 13-19.
10. Bu Z, Zheng Z, Zhang L, Li Z, Sun Y, Dong B, et al. LGR5 is a promising biomarker for patients with stage I and II gastric cancer. Chin J Cancer Res 2013; 25(1): 79-89.
11. Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, Rodermond H, Clevers H, Medema JP. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. Stem Cells 2012; 30(11): 2378-2386.
12. Simon E, Petke D, Böger C, Behrens HM, Warneke V, Ebert M, Röcken C. The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. PLoS One 2012; 7(4): e35486.
13. Kleist B, Xu L, Li G, Kersten C. Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol 2011; 4(4): 327-335.
14. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. Cancer Res 2006; 66(4): 1883-1890.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1): 57-70.
16. Davies EJ, Marsh V, Clarke AR. Origin and maintenance of the intestinal cancer stem cell. Mol Carcinog 2011; 50(4): 254-263.
17. Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest 2000; 105(11): 1493-1499.
18. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest 2001; 107(11): 1395-1402.
19. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer .Cell 2007; 128(4): 683-692.
20. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. Dev Cell 2010; 19(5): 698-711.
21. Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. Cell Host Microbe 2014; 15(3): 306-316.
22. Xuan SY, Li N, Qiang X, Zhou RR, Shi YX, Jiang WJ. Helicobacter infection in hepatocellular carcinoma tissue. World Journal of Gastroenterology 2006; 12(15): 2335-2340.
23. Uehara T, Ma D, Yao Y, Lynch JP, Morales K, Ziober A, et al. H. pylori infection is associated with DNA damage of Lgr5-positive epithelial stem cells in the stomach of patients with gastric cancer. Dig Dis Sci 2013; 58(1): 140-149.
24. Levi E, Sochacki P, Khoury N, Patel BB, Majumdar AP. Cancer stem cells in Helicobacter pylori infection and aging: Implications for gastric carcinogenesis. World J Gastrointest Pathophysiol 2014; 5(3): 366-372.
25. Wang X, Wang X, Liu Y, Dong Y, Wang Y, Kassab MA, et al. LGR5 regulates gastric adenocarcinoma cell proliferation and invasion

Helicobacter pylori generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. Oncogene 2014; 33(32): 4123-4131.

via activating Wnt signaling pathway. Oncogenesis 2018; 7(8): 57.

26. Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Mégraud F, Varon C.