

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

Marzieh Sadeghiani¹,
Heshmat Shahi¹,
Nader Bagheri²,
Somayeh Reisi³,
Ghorbanali Rahimian⁴,
Reza Rashidi⁴,
Mohammadhadi Shafigheardestani⁴,
Morteza Hashemzadeh Chaleshtori⁵,
Mahmoud Rafieian-Kopaei⁶,
Ghasem Ramezani⁷,
Fereshteh Fatollahi⁷,
Elaheh Shahverdi⁷,
Hedayatollah Shirzad⁵

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).

مقایسه بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۷ در بافت مخاط معده بیماران آلوده به عفونت هلیکوباکتریلوری و بیماران غیر آلوده

مرضیه صادقیانی^۱
حشمت شاهی^۱
نادر باقری^۲
سمیه رئیسی^۳
قربانعلی رحیمیان^۴
رضا رشیدی^۴
محمد هادی شفیق اردستانی^۴
مرتضی هاشم زاده چالشتی^۵
محمود رفیعیان کوپایی^۶
قاسم رضانی^۷
فرشته فتح الهی^۷
الهه شاهوردی^۷
هدایت اله شیرزاد^۵

چکیده

سابقه و هدف: بیان فاکتورهای رشد، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فاکتورهای فیروژنیک و سایتوکاین‌ها می‌توانند باعث ایجاد تغییرات در معده افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری 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 غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری با ناراحتی‌های گوارشی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی از ۵۰ بیمار مثبت و ۵۰ بیمار منفی از لحاظ هلیکوباکتریلوری که به علت مشکلات گوارشی به بیمارستان هاجر شهر کرد در سال ۱۳۹۳ مراجعه کرده بودند، اطلاعات دموگرافیک جمع‌آوری و نمونه‌گیری انجام شد. ابتدا از DNA استخراج شده، حضور ژن‌های UreC و 16sRNA 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 هلیکوباکتریلوری به طور معنی‌داری بالاتر از بیماران غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری بود ($p < 0.001$).

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.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتریلوری، ماتریکس متالوپروتئیناز-۷، بیماری‌های گوارشی، Real time-PCR

مقدمه

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

E-mail: shirzad1951@yahoo.com

مؤلف مسئول: هدایت اله شیرزاد- شهر کرد: رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، دانشکده پزشکی

۱. کارشناس ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۲. دانشجوی دکتری ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران

۴. استادیار، گروه گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۶. استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

۷. کارشناس پرستاری، بیمارستان هاجر، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۲/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

اسیدی معدده 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 (۱-۳). 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 معدده پیشروی کند که خطر سرطان معدده 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 معدده در ارتباط است (۵). توانایی بیماریزایی باکتری به عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای ژنتیکی میزبان، شرایط محیطی و فاکتورهای بیماریزایی باکتری ارتباط دارد (۶، ۷). هلیکوباکتریلوری در سال ۱۹۹۴ میلادی توسط سازمان بهداشت جهانی در کلاس یک کارسینوژن‌ها قرار گرفته است که آلودگی با آن می‌تواند ابتلا به زخم معدده را ۱۰ تا ۲۰ درصد و ریسک سرطان‌های پیشرفته معدده 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 معدده به علت هلیکوباکتریلوری است که دومین سرطان منجر به مرگ در دنیا است (۴). سرطان معدده ناشی از پیشرفت تغییرات مخاطی معدده از گاستریت مزمن، آتروفی مخاط معدده، 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 نابجای 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 اندوپیتیداز خارج سلولی وابسته به روی تشکیل شده است که بیش‌ترین اهمیت را پروتئینازها دارند.

ماتریکس متالوپروتئینازها به علت تفاوت در ساختار دومین و سوبستراهای متفاوت در ماتریکس خارج سلولی به شش گروه تقسیم می‌شوند که شامل کلاژنازها، ژلاتینازها، استرومیلازین‌ها، ماتریلازین‌ها (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 معدده 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

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 (۱۳، ۱۴). هم‌چنین طبق برخی یافته‌ها از مهم‌ترین شرایط بدخیمی‌هایی از جمله سرطان می‌توان به مهاجرت، جای‌گیری 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، کراتینوسیت‌ها، 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 هلیکوباکتریلوری 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 TNF- α ، Fas و کموکاین CXC احتمالاً نقش داشته باشند (۱۶). یکی از علل شایع بیماری‌های گوارشی، عفونت با هلیکوباکتریلوری 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 و حساسیت بسیار بالایی برخوردار هستند، می‌توان برای تشخیص هرچه سریع‌تر و جلوگیری از پیشرفت بیماری بهره جست. به نظر می‌رسد که از اطلاعات به‌دست آمده 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 غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری با ناراحتی‌های گوارشی بوده است.

مواد و روش‌ها

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 هم‌چنین ۵۰ نمونه از افرادی که بدون عفونت هلیکوباکتریلوری 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 و 16srRNA به روش PCR در DNA به ترتیب با کمک پرایمرهای اختصاصی تعیین شد (۱۷). تشخیص هلیکوباکتریلوری براساس تست اوره‌آز سریع، مولکولی

و تهیه لام رنگ آمیزی شده از بیوپسی برای تشخیص باکتری در بافت معده انجام شد و التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه بندی شدند. بیمارانی که تست های اوره آز، بررسی مولکولی حضور ژن های UreC و 16srRNA و پاتولوژی آن ها از لحاظ تشخیص هلیکوباکتریلوری مثبت بود در گروه افراد آلوده و بیمارانی که هر سه تست در آن ها منفی بود در گروه غیر آلوده قرار گرفتند. بیمارانی که یکی از تست های نام برده در آن ها مثبت و تست های دیگر منفی بود، در این مطالعه وارد نشدند.

روش PCR برای تشخیص حضور ژن های 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 پلیمرز (سیناژن ساخت ایران)، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۲ میکرولیتر بافر 10X (سیناژن ساخت ایران)، dNTP ۲/۵ میکرومولار به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ میلی مولار 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 میکروتیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ سیکل، پس ۳۰ دقیقه در ۹۵ درجه، پس از آن ۳۰ دقیقه در ۵۸ درجه سانتی گراد و ۳۰ دقیقه دیگر در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۵ سیکل قرار گرفتند و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ سیکل قرار داده شدند. سپس محصول PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد در جریان ۱۰۰ میلی آمپر به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شدند.

استخراج RNA و تهیه cDNA

به منظور پایدار کردن mRNA یکی از بیوپسی ها بلافاصله بعد از نمونه گیری در محلول استخراج Biozol (Bioflux-Japan) قرار گرفت و فوراً به فریز

۷۰- درجه سانتی گراد 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 اندازه گیری و سپس ۳ میکرو 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 واکنش های 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) مولکول های cDNA می شود، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، 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. واکنش ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوپ های ۰/۱ میلی لیتری انجام گردید. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ pm و ۰/۲ میکرولیتر از پروب با غلظت ۱۰ pm، ۱۰ میکرولیتر آب DNase free و ۲ میکرولیتر cDNA به عنوان الگو استفاده و سپس نمونه مورد نظر در دستگاه قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده و ژن β -actin به عنوان ژن رفرانس در نظر گرفته شد (۲۰-۱۸).

آنالیز داده ها

پس از ثبت اطلاعات مورد نظر از بیماران در فرم های مخصوص برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. هم چنین جهت رسم نمودار از نرم افزار Graph Pad Prism-5 و t-test استفاده گردید و در نهایت $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

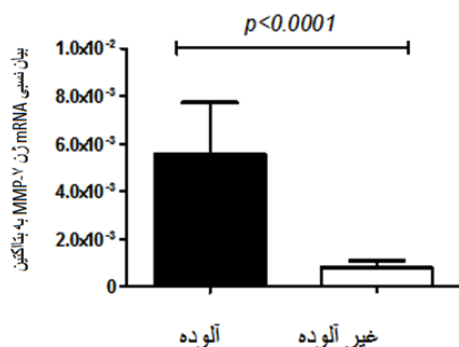
جنسیت بیماران در دو گروه آلوده (۲۷ زن و ۲۳ مرد) و غیر آلوده (۲۸ زن و ۲۲ مرد) در کل شامل ۵۷ بیمار مرد و ۴۳ بیمار زن بود. میانگین سن بیماران در گروه آلوده $2/12 \pm 44/3$ سال و در گروه غیر آلوده $2/39 \pm 46/5$ سال بود.

پرایمرها و پروب های استفاده شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است. نمونه ای از نتایج real-time PCR در نمودار شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر و پروب های مورد مطالعه

اندازه محصول (جفت باز)	توالی پرایمرها و پروب ژن بتا اکین	
پرایمر رفت	5-AGCCTCGCCTTTGCGCA-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	

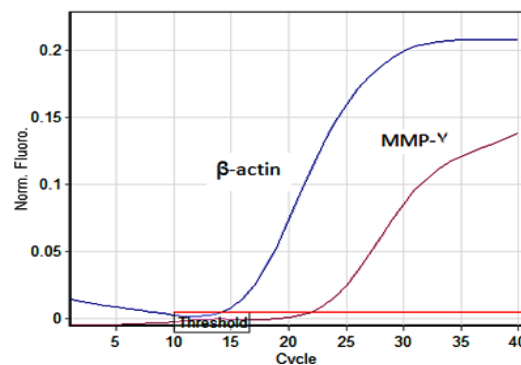
افراد غیر آلوده ($p < 0/0001$) وجود داشت به طوری که میانگین بیان ژن MMP-7 در گروه هلیکوباکتریلوری مثبت $0/005572$ و در گروه هلیکوباکتریلوری منفی $0/0007965$ بود پس تفاوت بیان ژن MMP-7 در گروه هلیکوباکتریلوری مثبت در مقایسه با گروه هلیکوباکتریلوری منفی $6/99$ برابر شده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: سطح بیان ژن MMP-7 در نمونه بافت بیماران آلوده و غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری

بحث

بر طبق مطالعات انجام شده باکتری هلیکوباکتریلوری عامل اصلی بیماری های معده- روده ای از جمله گاستریت مزمن و زخم های گوارشی محسوب می شود. این باکتری به عنوان یک عامل بیماری زای مهم در ایجاد التهاب معده، زخم معده و دئونوم نام برده می شود (۲۲، ۲۱۸). 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 می شوند. فراوانی کلی عفونت تا حد زیادی به شرایط اقتصادی و اجتماعی وابسته است (۲۴). مطالعات مختلف نشان داده اند که عفونت هلیکوباکتریلوری با مکانیسم ناشناخته باعث افزایش بیان MMP-1، MMP-2، MMP-3، MMP-7 و MMP-9 می شود (۲۷-۲۵). در این مطالعه هدف اصلی بررسی میزان بیان ژن MMP-7 در بیماران آلوده و غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری بوده است که به انواع مختلفی از اختلالات گوارشی مبتلا



نمودار شماره ۱: پیشرفت واکنش real time-PCR در بیان ماتریکس متالوپروتیناز مورد 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 می دهد.

بیان ژن MMP-7 در افراد آلوده و غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری

آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی داری بین میزان بیان ژن MMP-7 در افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری و

بودند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان بیان ژن MMP-7 در گروه بیماران آلوده با اختلالات گوارشی نسبت به بیماران غیر آلوده 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 (Human gastric carcinoma cell) AGS صورت گرفت، نشان داد که گونه‌های دیگر هلیکوباکتریلوری از جمله هلیکوباکتر ژرونی و باکتری اشرشیا کلی قادر به القای تولید MMP-7 نبوده و این ویژگی فقط از خصوصیات هلیکوباکتریلوری می‌باشد (۳۰). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بیان MMP-7 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری نسبت به افراد غیر آلوده به طور معنی داری افزایش می‌یابد و فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکتریلوری که اختصاصی این باکتری می‌باشند، ممکن است در القای تولید MMP-7 نقش داشته باشند (۳۱، ۳۰). مطالعه Chung و همکاران نشان داد که بیان MMP-7 در بیماران دارای سرطان معده در مقایسه با بیماران دارای دیسپلازی معده به طور چشم‌گیری بالا می‌باشند. نتایج این گروه از محققین نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری در بیان MMP-7 در گروه بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری با سرطان معده در مقایسه با گروه بیماران غیر آلوده و دارای سرطان معده وجود ندارد. هم‌چنین بیان MMP-7 در بیماران دارای سرطان معده در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری با زخم‌های گوارشی و بیماران آلوده و فاقد زخم گوارشی به طور معنی داری بالاتر می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که خود هلیکوباکتریلوری 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 هلیکوباکتریلوری 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 معنی داری در میزان سطح سرمی MMP-7 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری در مقایسه با افراد غیر آلوده دیده نمی‌شود (۳۲).

مطالعه Krakowiak و همکاران نشان داد که موش‌های فاقد ژن MMP-7^{-/-} در پاسخ به عفونت هلیکوباکتریلوری آسیب و التهاب شدیدتر نسبت به عفونت هلیکوباکتریلوری 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 بیان MMP-7 نقش مهمی در محدود کردن آسیب‌های ایجاد شده توسط عفونت هلیکوباکتریلوری که ممکن است باعث ایجاد عفونت مزمن شود، را داشته باشد (۹). مطالعه Caruso و همکاران نشان داد که IL-21 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری به طور معنی داری افزایش می‌یابد و سلول‌های اپی تلیال 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 هلیکوباکتریلوری 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

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.

مطالعات ارتباط بین فاکتورهای مختلف بیماریزای باکتری و افزایش برخی از ماتریکس متالوپروتینازها 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 رو که 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 هلیکوباکتریلوری به عنوان یک عامل کلیدی مرتبط با پیشرفت و پیش‌آگهی بد بیماری‌های گوارشی دانست، ارزشمند است. لذا این مسائل ارزش تشخیص سریع و

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'Elis MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2014; 19(Suppl 1): 19-26.

9. Krakowiak MS, Noto JM, Piazzuelo 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, Swingle 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

- 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.