بررسی میزان بیان ژن ID1 در سلول های AGS ترنسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV3-tagD

مرضیه رستم زاده رنانی[۱]، عباس دوستی[۲*]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۷

چکیده

مقدمه: پروتئین ID، باعث افزایش تکثیر سلولی می شود و از طرفی تمایز را مهار کرده که ارتباط آن با روند تومورزایی روده را مشخص می کند. عفونت هلیکوباکتر با بیان ژن های مختلف ID در ارتباط است و بنا بر این هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن ID1 در سلول های AGS ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب pFLAG-CMV-3-tagD است.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر سلول های AGS در محیط کشت RPMI-1640 حاوی درصد سرم جنین گاوی رشد داده شد. این سلول ها با دو پلاسمید pFLAG-CMV-3-tagD یا pFLAG-CMV-3 ترانسفکت شدند و سلول های دریافت کننده پلاسمید با افزودن ۶۰۰ میلی گرم در لیتر G418، انتخاب گردیدند. سپس RNA کل سلول با استفاده از محلول RNX-Plus تخلیص شد و سنتز cDNA با کمک کیت انجام شد. سطح بیان mRNA ژن ID1 به روش q-RT PCR و با کاربرد پرایمرهای مناسب بررسی شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری Indepent t-test بیان هر یک از ژن ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: با روش RT-PCR، بیان موفقیت آمیز ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در سلول های AGS تایید شد. آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان ژن ID1 به صورت معنی داری در سلول های AGS تیمار شده با tagD نسبت به سلول های کنترل، کاهش یافته است(P=0.0113).

بحث و نتیجه گیری: تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن ID1 در سلول های تحت تیمار با ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری، تغییر می یابد و به نظر می رسد، ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: باکتری هلیکوباکتر پیلوری، tagD، ID1

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

Email: abbasdoosti@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

مقدمه

سرطان معده در جهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می شود(۱). این سرطان یکی از شایع ترین بدخیمی ها در سراسر جهان بوده و جزء بیماری های چند عاملی دسته بندی می شود و عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی به عنوان مارکرهای خطر برای ابتلا به سرطان معده معرفی شده اند(۴-۲). در مورد عوامل خطر محیطی ایجاد سرطان معده می توان به نقش عفونت هلیکوباکتر پیلوری، سبک زندگی و تغذیه اشاره نمود. هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری باسیلی شکل کوچک گرم منفی با تحرک بسیار زیاد است که در لایه مخاطی معده انسان، عفونت ایجاد می نماید. عفونت هلیکوباکتر پیلوری عامل بسیار تاثیرگذاری در ایجاد خطر ابتلاء به سرطان معده است(۵). به طور کلی عفونت اولیه هلیکوباکتر پیلوری سبب ایجاد یک گاستریت خفیف می شود و در صورت ادامه روند بیماری زایی و عدم درمان زخم معده، التهاب آتروفیک معده ایجاد خواهد شد و افراد مبتلا به این التهاب، در خطر ایجاد بدخیمی و سرطان معده قرار می گیرند(۶). ژن tagD در هلیکوباکتر پیلوری یک آنزیم به نام تیول پراکسیداز را رمزگذاری می نماید که دارای ۱۶۶ اسیدآمینه است. تیول پراکسیداز یکی از ادهسین های مهم هلیکوباکتر پیلوری است و در تجمع این باکتری در مخاط معده انسان نقش ویژه دارد(۸-۶). از سوی دیگر این ژن نقش مهمی را در زنده ماندن هلیکوباکتر پیلوری در شرایط استرس اکسیداتیو معده ایفا می کند. تیول پراکسیداز یکی از اعضای خانواده پروتئین های پراکسی ریدوکسین بوده و از بیشترین آنزیم های آنتی اکسیدانی در باکتری ها به شمار می رود. با این که مطالعات گسترده ای روی هلیکوباکتر پیلوری انجام گرفته است، اطلاعات کمی در مورد ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم تیول پراکسیداز هلیکوباکتر پیلوری در دسترس وجود دارد. تیول پراکسیداز هلیکوباکتر به عنوان اسکاونجر(بازدارنده) H_2O_2 در حضور تیوریدوکسین (Trx) عمل می کند. میکروارگانیسم هایی که در آن ها آنزیم تیول پراکسیداز بی اثر شده است، نوعی کاهش توانایی در تجمع و کلونیزاسیون در معده موش های مورد مطالعه از خود بروز می دهند. از سویی دیگر به از بین رفتن توسط پراکسید و سوپراکسید در مقایسه با باکتری نوع وحشی حساس تر هستند. تیول پراکسیداز هم چنین نقش مهم و حیاتی را در مقابله با فشار اکسیداتیو ایفا می کند و موجب تحریک سیستم ایمنی میزبان می شود(۸).

ژن ID1 یا مهارکننده اتصال DNA در انسان در موقعیت 20q11.21 قرار دارد و دارای یک اگزون می باشد. تحقیقات نشان داده است که فاکتور رونویسی ID، با تکثیر، تمایز و آپوپتوز رابطه دارد. پروتئین ID نقش های خود را معمولاً با مهار پیوند بین فاکتورهای رونویسی با helix-loop-helix ایفا می کند. افزایش بیان پروتئین ID، سبب افزایش تکثیر سلولی شده و از سوی دیگر تمایز را مهار کرده که این موارد ارتباط آن با روند تومورزایی روده را کاملاً مشخص می کند. عفونت هلیکوباکتر بر بیان ژن های مختلف ID ارتباط دارد و به دنبال آن با توجه به تغییرات بیان ژن ID1 وقوع یا عدم وقوع سرطان معده قابل بررسی است(۱۲-۹). بنا بر این با توجه به ارتباط هلیکوباکتر پیلوری با بیان ژن ID1 در سلول های پوششی معده، هدف از این تحقیق بررسی اثرات ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری بر بیان ژن ID1 در سلول های رده سرطان معده AGS به روش q-RT-PCR می باشد.

مواد و روش ها

رده سلولی AGS و کشت: در این پژوهش از سلول های سرطانی معده رده AGS استفاده شد(۱۳) که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد گرفته شد. ابتدا محیط کشت پایه RPMI 1640 به محیط کشت کامل تبدیل شد. به این منظور، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله(FBS)، پنی سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم(Pen-strep) بر میلی لیتر به محیط پایه اضافه شد(۱۴). سلول های AGS به منظور نگهداری طولانی مدت در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد یا در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد در کرایو تیوب های مخصوص نگهداری می شوند. لذا برای شروع نمودن کشت سلول های مورد نظر، این سلول ها از فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد خارج گردیدند. کرایوتیوب حاوی سلول ها در بن ماری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا محتویات آن ذوب شوند. سپس مواد و سلول های درون کرایوتیوب در شرایط کاملاً ا ستریل و زیر هود بیولوژی کلاس ۲، به داخل یک فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شدند. این فالکون ۱۵ میلی لیتری، محتوی ۳ میلی لیتر محیط کش ـ ـت RPMI به ه ـ ـ ـمراه ۱۰ درصد FBS بود. ر سوب گیری از سلول ها با انجام سانتریفیوژ با شرایط ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت و محلول رویی دور ریخ ـ ـته شد. رس ـ ـوب سلول ها در ۴ تا ۵ میلی لیتر محیط کشت کا مل RPMI حل شد. سو سپان سیون سلولی حا صل به فلا سک T25 منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شد.

پلاسمید pFLAG-CMV-3-tagD و تکثیر آن: در پژوهش حاضر از پلاسمید pFLAG-CMV-3-tagD استفاده شد(۱۵) که پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3 حامل ژن tagD باکتری هلیکوباکتر پیلوری و هم چنین پلاسمید pFLAG-CMV-3 بدون ژن خارجی بود و از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد تهیه شد. تکثیر پلاسمید با انتقال آن به میزبان باکتریایی که عمدتاً شامل سویه های مناسب از باکتری اشریشیاکلی است، انجام می شود. جهت انجام ترانسفورماسیون باکتری E.coli با پلاسمید، در سلول مستعد ساخته شد و پس از رشد کلنی های باکتریایی، تعداد ۱۰ عدد از آن ها به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شده و روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک، به صورت ماتریکس کشت داده شدند. پلیت ماتریکس نیز به منظور رشد باکتری ها به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Favorgene انجام شد. در نهایت برای تایید صحت پلاسمید استخراج شده و بررسی حضور ژن کلون شده(tagD) در آن از تکنیک PCR استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی tagD در این مرحله برای پرایمر Forward 5'AGCGTCGACATTAGAAAGGATTTA ACCATG3' و برای پرایمر Reverse 5'TCCGAGTACTAACTTCCTATTCCAA CAC3' بود که سایز باند آن ۵۳۷ bp بود.

بعد از انجام تکنیک PCR تایید پلاسمید نوترکیب به روش هضم آنزیمی صورت گرفت که برای تایید حضور ژن tagD در پلاسمید pFLAG-CMV-3، از هضم آنزیمی دوگانه استفاده شد و آنزیم محدودالاثر BglII و EcoRV مورد استفاده قرار گرفت.

روش انتقال پلاسمید به سلول: برای انتقال پلاسمید به سلول، سلول های AGS درون فلاسک T25 کشت داده شدند، زمانی که سلول ها به تراکم ۷۰ درصد رسیدند از آن ها رسوب سلولی تهیه شد و سوسپانسیون سلولی در ۱ میلی لیتر از محیط کشت تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون همراه با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو روی لام نئوبار قرار گرفت و پس از لامل گذاری شمارش شد و سپس تعداد سلول ها در ۱ میلی لیتر محیط کشت محاسبه شد و در نهایت از سلول های گروه های تیمار و شاهد، رسوب گیری انجام شد.

تشخیص آپوپتوز: برای تعیین درصد سلول های آپوپتوز شده از کیت انکسین V برای تجزیه و تحلیل سریع مراحل مختلف آپوپتوز استفاده شد. انکسین V به فسفاتیدیلسرین(PS) متصل می شود که در قسمت داخلی غشای سیتوپلاسمی در سلول های سالم قرار دارد. اما پس از شروع آپوپتوز، PS به سرعت در قسمت بیرونی غشای سیتوپلاسمی جا به جا می شود که تصور می شود در تشخیص ماکروفاژ نقش مهمی را ایفا می کند، بنا بر این سلول های آپوپتوز را می توان به سرعت فاگوسیتوز کرد. اتصال انکسین V به PS وابسته به Ca^2 است و بنا بر این یک بافر واکنش حاوی Ca^2 خاص در طول فرآیند اتصال مورد نیاز است. کیت تشخیص آپوپتوز MabTag حاوی به نام propidium یدید است که باعث شناسایی سلول ها از یکدیگر می شود. در مرحله بعد برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus شرکت سیناکلون استفاده شد و روش DNase treatment و سنتز cDNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما صورت گرفت.

برای اثبات درستی cDNA سنتز شده ابتدا PCR با پرایمرهای ژن GAPDH انجام شد. سپس جهت تعیین دمای دقیق Anneling پرایمرها ابتدا PCR با

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

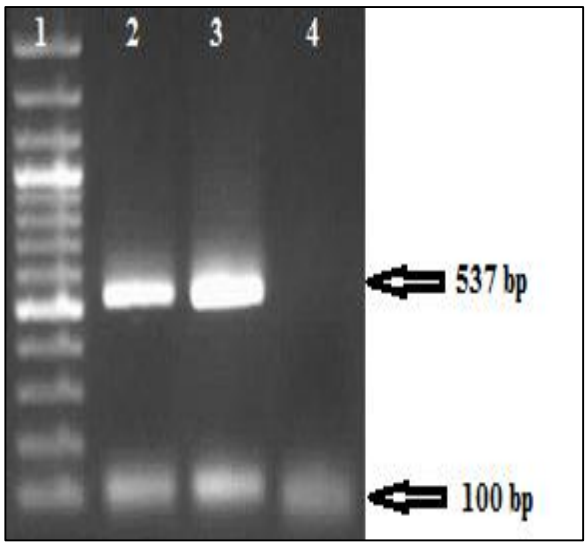
پرایمرهای مناسب انجام گرفت که توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق برای ژن IDI F: 5'CGACATGAACGGCTGTTACTCAC3' و R: 5' CTCGCCGTTGAGGGTGCTG3' بود که دمای اتصال آن ۶۵ درجه سانتی گراد و سایز باند ۲۰۵ جفت باز بود. هم چنین پرایمرهای مورد استفاده برای ژن GAPDH F: 5'AAATCCCATCACCATCTTC CAG 3' و R:5'CAGAGATGATGACCCTTTTGGC3' بود و دمای اتصال آن ۶۳ درجه سانتی گراد و اندازه محصول آن ۱۸۳ جفت باز بود. در نهایت محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس با نور UV مشاهده و تصویر تهیه شد.

تکنیک Real time RT-PCR: برای بررسی میزان تغییر بیان در ژن مورد مطالعه، در سلول های رده سلولی AGS در دو سلول ترانسفکت شده و کنترل، از جفت پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده برای انجام real time RT-PCR استفاده شد(۱۶). هم چنین از پرایمرهایی برای بررسی میزان تغییر بیان ژن خانه دار GAPDH به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. مواد به نسبت های ۰/۴ میکرولیتر پرایمر پیشرو و پیرو، ۲ cDNA (25ng/µL) میکرولیتر، SYBR Green master mix (2X) ۷/۵ میکرولیتر و ddH_2O ۴/۷ مخلوط گردید و سپس درون دستگاه قرار داده شد. برنامه دمایی و زمانی تایید شده در این مرحله به این صورت بود که برای Primary Denaturasion ۳ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، Denaturation ۲۰ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، Annealing ۲۵ ثانیه و ۶۵ درجه سانتی گراد و Extension ۲۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تعداد چرخه های این تکنیک ۴۵ در نظر گرفته شد و در نهایت داده ها تجزیه و تحلیل شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها: با استفاده نمودن از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری Indepent t-test بیان هر یک از ژن ها بررسی و مقایسه شد. اگر $P\leq0.05$ باشد، تفاوت داده ها از لحاظ آماری معنی دار محسوب می گردد.

یافته‌های پژوهش

تایید صحت پلاسمیدها به روش PCR و هضم آنزیمی: با انجام PCR به وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن TagD، باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به این ژن روی ژل آگارز دیده شد. نتیجه این آزمایش در شکل شماره ۱ دیده می شود.

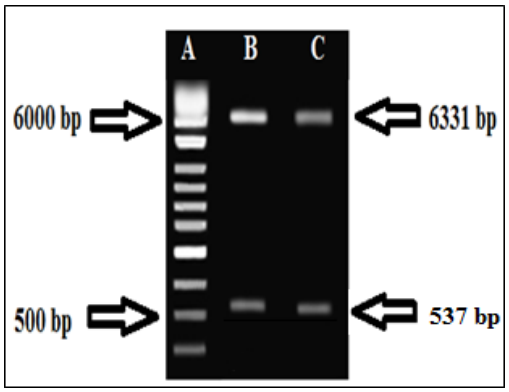


شکل شماره ۱. نتایج PCR بر روی پلاسمید استخراج شده که حضور باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن tagD صحت استخراج پلاسمید را تایید کرد. چاهک شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک شماره ۴ کنترل منفی می باشد. هم چنین چاهک ۲ و ۳ سایز باند ۵۳۷ ژن tagD است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

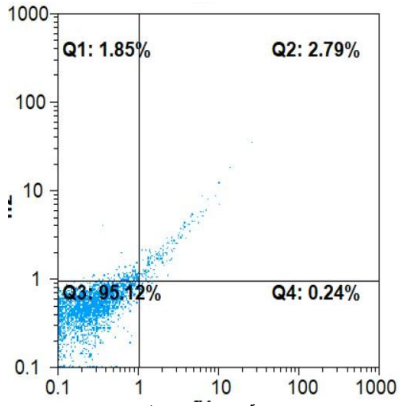
در این تحقیق انجام برش آنزیمی با دو آنزیم BglII و EcoRV روی پلاسمید نوترکیب pFLAG-CMV-3-tagD سبب تشکیل دو باند ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به پلاسمید و باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن tagD شد که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل شماره ۲. هضم آنزمی وکتور حاوی ژن tagD. قطعه نگین ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور و قطعه ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن tagD است. چاهک A: مارکر و چاهک B و C قطعات حاصل از برش آنزیمی.

لازم به ذکر است که بعد از ترانسفکت و انتقال پلاسمید به سلول های AGS، جهت غربالگری سلول هایی که پلاسمید را دریافت نموده بودند، آنتی بیوتیک نئومایسین افزوده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. به دلیل این که پلاسمید ژن مقاومت به نئومایسین را دارا بود، سلول هایی که پلاسمید دریافت کرده بودند، توانایی رشد و تکثیر داشتند. پس از گذشت ۲ هفته از کشت سلول ها در مجاورت نئومایسین، سلول های پایدار دریافت کننده پلاسمید به دست آمدند.

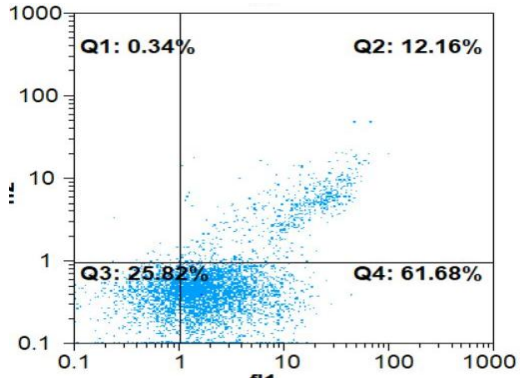
نتایج بررسی آپوپتوز با استفاده از کیت انکسین: در طی مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا منتقل می شود که انکسین V به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می شود. به علاوه PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری می باشد که در شکل های شماره ۳ و ۴ به تصویر کشیده شده است. همان طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می شود درصد سلول های زنده در ناحیه Q3 ۹۵ درصد بیشتر از سایر گروه ها می باشد. درصد سلول های آپاپتوز شده جوان در ناحیه Q4 یعنی سلول هایی که در مراحل اولیه آپاپتوز به ۶۱/۶۸ درصد رسیده است. درصد سلول های آپاپتوز شده دیررس یا نکروزی در ناحیه Q2 ۱۲/۱۶ درصد بود که در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.



شکل شماره ۳. نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه کنترل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

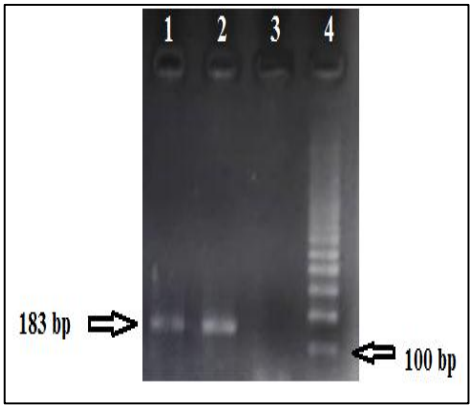
[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]



شکل شماره ۴. نتایج بررسی آپوپتوز به روش فلوسایتومتری در گروه تیمار

نتایج بررسی کیفی و کمی خلوص RNA استخراج شده: برای تعیین مقدار RNA مورد نظر از دستگاه نانودراپ استفاده شد و میزان غلظت RNA و نیز نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت که در مورد اکثر نمونه های مورد بررسی در محدوده طبیعی (۲- ۱/۸) قرار داشت. نسبت بالاتر از ۲ و پایین تر از ۱/۸ به ترتیب نشانه آلودگی با DNA و پروتئین می باشد. غلظت و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعدادی از RNAs استخراج شده در جدول شماره ۴ آمده است. هم چنین صحت RNA استخراج شده بر روی ژل آگـارز بررسی شد.

نتیجه تایید سنتز cDNA به روش PCR: از ژن GAPDH در تمام شرایـــط و در تمام سلول ها، رونویسی می شود و RNA آن در دسترس است. به منظور تایید صحت سنتز cDNA، با پرایـــمرهای اختصاصی این ژن، واکنش PCR انجام شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگـارز، باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به GAPDH و بانـد ۵۳۷ جـــفت بازی برای ژن tagD دیده شد که موید ســـنتز مناسب cDNA است و در شـکل شماره ۵ نشان داده شده است.



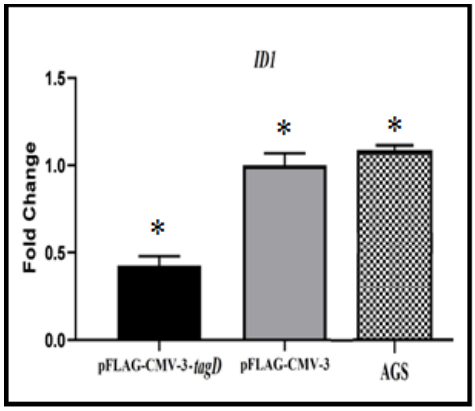
شکل شماره ۵. بررسی صحت سنتز cDNA به روش PCR. چاهک ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱ و ۲ باند ۱۸۳ جفت بازی مربوط به ژن GAPDH و چاهک ۳ کنترل منفی(فاقد DNA الگو).

نتایج آنالیز آماری: نتایج آنالیز آمـــاری مربوط به ژن‌های ID1 به وسیله نرم افزار SPSS انجام شد. برای انجام این آنالیز، Ct هر نمونه(هم نمونه ژن مورد نظر و هم نمونه ژن کنترل داخلی) به صورت جداگانه برای انجام آنالیز و به دست آوردن تغییر بیان یادداشت گردید. پس از نرمالایز کردن داده ها با ژن خانه دار و به دست آوردن میزان بیان، برای نرم افزار تعریف می شود و در نهایت نتایج به صورت نمودار قابل مشاهده می باشد. در این آنالیز تغییر بیان ژن ID1 با کاهش بیان همراه بود که این کاهش بیان معـنی دار بود و مـــیزان P (P=0.0113). بود. از سوی دیگر نتایج بررسی این ژن در سلول های ترانسفکت نشده نسبت به سلول های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

وکتور ترانسفکت شده PFLAG-CMV-3 معنادار بود. نتایج حاکی از آن است که در اثر بیان ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری بیان ژن ID1 کاهش نشان می دهد که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است.



شکل شماره ۶. آنالیز آماری بیان ژن ID1. بیان ژن ID1 در گروه مورد آزمایش(دریافت کننده ژن tagD) نسبت به گروه PFLAG-CMV-3 و AGS به طور معنی داری کاهش داشته است(P=0.0113) که تعداد یک ستاره نشانه معنادار بودن است.

بحث و نتیجه گیری

عفونت هلیکوباکتر پیلوری انتشار جهانی دارد و تقریباً نیمی از جمعیت دنیا یعنی بیش از ۲ میلیون نفر به عفونت مزبور مبتلا هستند. در بررسی های بالینی مشخص شده که درمان ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری می تواند باعث بهبود لنفوم گاستریک شود. عفونت هلیکوباکتر پیلوری ممکن است در رابطه با بیماری های خارج از دستگاه گوارش نظیر بیماری کرونر قلب و امنوره نیز باشد. اما این یافته ها نیاز به تحقیق بیشتری دارند(۱۷). فاکتور رونویسی ID، با تکثیر، تمایز و آپوپتوز رابطه دارد و افزایش بیان پروتئین ID، سبب افزایش تکثیر سلولی شده و از سوی دیگر تمایز را مهار کرده که این موارد ارتباط آن با روند تومورزایی روده را کاملاً مشخص می کند(۱۸). عفونت هلیکوباکتر بر بیان ژن های مختلف ID ارتباط دارد و تحقیقات زیادی در این مورد صورت گرفته است به عنوان مثال چن و گروهی از محققان در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که ژن ID3 نقش مهمی در تمایز و تکثیر سلول ها دارد. در این تحقیق مشخص شد که در طی روند تمایز B-cell ها، میزان بیان ژن ID3 کاهش می یابد تا ژن های دخیل در سیگنالینگ سلولی فعال شوند و فرآیند تمایز B-cell تکمیل گردد(۱۹). Kyei و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی بیان ژن های ID1 و ID3 در رشد و بقای سلول های بند ناف انسان پرداختند. آن ها اظهار داشتند که مهار Id1 و Id3 ممکن است باعث فعال شدن سلول اندوتلیال و رگ زایی شود و هم چنین ممکن است یک هدف مهم برای توسعه روش های درمانی جدید برای اختلالات رگ زایی فراهم کند(۱۰). از طرفی Singh و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی بیان ID1 در سلول های بنیادی خون ساز پرداختند. نتایج آن ها حاکی از آن بود که ID1 در سلول های بنیادی خون ساز (HSC) توسط سیتوکین هایی که ترویج تکثیر و تمایز HSC را ایجاد می کنند در خون سازی عملکرد دارد و هم چنین هدف قرار دادن ID1 به بهبود و عملکرد سلول های بنیادی کمک می کند(۲۰). از سوی دیگر در سال ۲۰۱۹ Sun و همکاران به بررسی ID1 در سرطان کولورکتال پرداختند و اظهار داشتند بین بیان این ژن و سرطان کولورکتال ارتباط وجود دارد و می تواند به عنوان یک هدف اصلی برای سرطان کولورکتال به حساب آید(۲۱). این نتایج با نتایج ما همسو بود چرا که به طور کلی تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن ID1 در سلول های تحت تیمار با ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری، تغییر می یابد و می تواند به عنوان مارکری برای شناسایی سرطان معده در نظر گرفته شود.

با توجه به ارتباط هلیکوباکتر پیلوری با بیان ژن ID1 در سلول های پوششی معده، هدف از این تحقیق

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

بررسی اثرات ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری بر بیان ژن ID1 در سلول های رده سرطان معده AGS به روش q-RT-PCR بود که در نهایت تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن ID1 در سلول های تحت تیمار با ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری، تغییر می یابد و به نظر می رسد، ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد این تغییر بیان نقش داشته باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه برگـــرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمـــایت معاونـــت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که در این پژوهش یاری رساندند کمال تشـــکر و قـــدردانی را می نمایند.

کد اخلاق: IR. IAU.SHK.REC.1399.026

References

1.Wang W, Du M, Li Z, Zhang L, Li Q, Xu Z, et al. A genetic variant located in miR-146b promoter region is associated with prognosis of gastric cancer. Cancer Epidemiol Preve Biomark2018;27:822-8. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-1054.

2.Gantuya B, Oyuntsetseg K, Bolor D, Erdene Y, Sanduijav R, Davaadorj D, et al. Evaluation of serum markers for gastric cancer and its precursor diseases among high incidence and mortality rate of gastric cancer area. Gastr Cancer2019;22:104-12. doi.10.1007/s10120-018-0844-8.

3.Khalili Z, Moghanibashi M, Ghaderi A. Association of rs61803665 polymorphism in the F11R gene with increased risk of gastric cancer. Asian Pac J Cancer Biol 2019;4:15-8. doi.10.31557/apjcb.2019.4.1.15-18.

4.Carneiro F, Grabsch HI. Pathogenesis of gastric cancer. Minimally Invasive Foregut Surgery for Malignancy 2015;5:61-72. doi.10.1007/978-3-319-09342-0_6.

5.Arslan N, Yılmaz O, Demiray E. Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol2017;23:2854. doi.10.3748/wjg.v23.i16.2854.

6.Graham DY. Helicobacter pylori update gastric cancer reliable therapy and possible benefits. Gastroenterology2015;148:719-31. doi.10.1053/j.gastro.2015.01.040

7.Austin CM, Wang G, Maier RJ. Aconitase functions as a pleiotropic posttranscriptional regulator in Helicobacter pylori. J Bacteriol2015;197:3076-86. doi.10.1128/JB.00529-15

8.Wang G, Olczak AA, Walton JP, Maier RJ. Contribution of the Helicobacter pylori thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. Infec Immun 2005;73:378-84. doi.10.1128/IAI.73.1.378-384.2005

9.Manzo BA, Crabtree JE, Campbell MF, Tweedle D, Potten CS, Bajaj M, et al. Helicobacter pylori regulates the expression of inhibitors of DNA binding proteins by gastric epithelial cells. Microbes Infec 2006;2:1064-74. doi.10.1016/j.micinf.2005.11.003

10.Kyei F, Asante DB, Edekor JAM, Sarpong E, Gavor E, Konja D. Down regulation of Id1 and Id3 genes affects growth and survival of human umbilical vein endothelial cells. J Appl Biol Biotechnol Vol 2016;4:23-9. doi.10.7324/JABB.2016.40204.

11.Chen S, Miyazaki M, Chandra V, Fisch KM, Chang AN, Murre C. Id3 orchestrates germinal center B cell development. Mole Cellular Biol2016;36:2543-52. doi.10.1128/MCB.00150-16.

12.Murase R, Sumida T, Kawamura R, Onish A, Hamakawa H, Mcallister SD, et al. Suppression of invasion and metastasis in aggressive salivary cancer cells through targeted inhibition of ID1 gene expression. Cancer letters2016;377:11-6. doi.10.1016/j.canlet.2016.04.021.

13.Li D, Ding J, Wang X, Wang C, Wu T. Fibronectin promotes tyrosine phosphorylation of paxillin and cell invasiveness in the gastric cancer cell line AGS. Tum J 2009;95:769-79. doi.10.1177/030089160909500621.

14.Safarpour M, Kazemi Z, Doosti E, Doosti A. Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. J Jahrom Uni Med Sci 2016;14:43-50. doi. mj.jums.ac.ir/article-1-910-en.pdf.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. J Jahrom Uni Med Sci 2016;14:43-51.doi. jmj.jums.ac.ir/article-1-910-en.pdf.
16.Marabita F, Candia P, Torri A, Tegner J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. Brief Bioinform2015;17:204-12. doi.10.1093/bib/bbv056/\.
17.Pandit S, Boktor M, Alexander JS, Becker F, Morris J. Gastroesophageal reflux disease a clinical overview for primary care physicians. Pathophysiology 2018;25:1-11. doi.10.1016/j.pathophys.2017.09.001.
18.Li L, Wei X, Wu B, Xiao Y, Yin M, Yang Q. SiRNA mediated knockdown of ID1 disrupts Nanog and Oct 4 mediated cancer stem cell likeness and resistance to chemotherapy in gastric cancer cells. Oncol lett2017;13:3014-24. doi.10.3892/ol.2017.5828.
19.De S, Zhang B, Shih T, Singh S, Winkler A, Donnelly R, et al. B cell intrinsic role for IRF5 in TLR9/BCR induced human B cell activation, proliferation and plasmablast differentiation. Front Immunol2018;8:1938. doi.10.3389/fimmu.2017.01938.
20.Singh SK, Singh S, Gadomski S, Sun L, Pfannenstein A, Magidson V, et al. Id1 ablation protects hematopoietic stem cells from stress induced exhaustion and aging. Cell Stem Cell2018;23:252-65. doi.10.1016/j.stem.2018.06.001.
21.Sun Y, Lai X, Yu Y, Li J, Cao L, Lin W, et al. Inhibitor of DNA binding 1mediates stemness of colorectal cancer cells through the Id1-c-Myc-Plac8 axis via the Wnt/β-catenin and Shh signaling pathways. Cancer Manage Res2019;11:6855. doi.10.2147/CMAR.S207167.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]

Evaluation of the Expression of ID1 Gene in AGS Cells Transfected with pFLAG-CMV3-tagD Recombinant Vector

Rostamzaderenani M[1], Doosti A[2]*

(Received: February 1, 2020 Accepted: September 7, 2020)

Abstract

Introduction: The ID protein enhances cell proliferation and inhibits differentiation, which determines its association with the process of intestinal tumorigenesis. Helicobacter infection is associated with the expression of different ID genes. This study aimed to investigate the expression of the ID1 gene in AGS cells transfected with the pFLAG-CMV-3-tagD recombinant vector.

Materials & Methods: In the present study, AGS cells were cultured in the RPMI-1640 medium containing 10% bovine fetal serum. Subsequently, these cells were transfected with two pFLAG-CMV-3-tagD or pFLAG-CMV-3 plasmids. Moreover, the plasmid recipient cells were selected by adding 600 mg/LG418. Following that, wwhole-cell RNA was purified using RNX-Plus solution, and the cDNA was synthesized using a kit. The mRNA expression level of ID1 was assessed using q-RT PCR with appropriate primers. Eventually, the expression of each gene was evaluated in SPSS software through an independent t-test. *Ethics code:* IR. IAU.SHK.REC.1399.026

Findings: The results of RT-PCR confirmed the successful expression of the helicobacter pylori tagD gene in AGS cells. Moreover, the gene expression analysis showed that the ID1 gene expression was significantly decreased in tagD-treated AGS cells, compared to the control cells (P=0.0113).

Discussions & Conclusions: The present study showed that the ID1 gene expression was altered in cells treated with the helicobacter pylori tagD gene. In addition, it seems that the helicobacter pylori tagD gene is involved in this expression change.

Keywords: Helicobacter pylori, TagD, ID1

1. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
**Corresponding author Email: abbasdoosti@yahoo.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.11]