ارتباط آلل‌های *i1* و *i2* ژن *vacA* هلیکوباکترپیلوری با خطر بروز سرطان معده: *گزارش کوتاه*

بتول متقی[1]، رضا صفرعلیزاده[1*]
مرتضی جبارپور بنیادی[1]
سعید لطیفی نوید[2]
محمدحسین صومی[3]، مجید مهدوی[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تبریز، خیابان ۲۹ بهمن، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی تلفن: ۳۳۳۹۲۶۹۴-۰۴۱
E-mail: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۰۵ آنلاین: ۱۳۹۳/۹/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به تنوع ژنومی سویه‌های مختلف هلیکوباکترپیلوری و ارتباط این ژن‌ها با بیماری‌های مختلف دستگاه گوارش تصمیم گرفتیم تا فراوانی آلل‌های *i1* و *i2* ژن *vacA* را در هلیکوباکترپیلوری‌های جدا شده از بیماران و ارتباط این ژنوتیپ‌ها را با بیماری‌های زخم معده و آدنوکارسینوما بررسی کنیم.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی، ۸۹ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌ها از شهریور سال ۱۳۹۱ تا خرداد سال ۱۳۹۲ از بیمارستان‌های امام‌رضا (ع) و شهید مدنی تبریز جمع‌آوری شدند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز فراوانی آلل‌های *i1* و *i2* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز رگرسیون چندگانه خطی و لجستیک ارتباط شدید بین آلل *i1* ژن *vacA* و سرطان معده را تایید کرد. در مقابل، ارتباط معناداری بین آلل‌های ناحیه *i* و خطر بروز زخم معده مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: آلل *i1* ژن *vacA* هلیکوباکترپیلوری را به‌عنوان پیشگویی در سرطان معده می‌توان شناخت.

کلمات کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، سرطان معده، آلل *i1*.

مقدمه

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای هلیکوباکترپیلوری، توکسین واکوئول‌زای A (VacA) می‌باشد که یک اگزوتوکسین ترشحی بوده و در ابتدا براساس توانایی‌اش در ایجاد واکوئول در سلول‌های کشت شده شناسایی شده است.[1] ژن *vacA* از دو بخش توالی نشانه (*s*) و بخش میانی (*m*) تشکیل شده و به‌تازگی یک منطقه بینابینی (*i*) بین نواحی *s* و *m* شناسایی شده که به دو زیر گروه *i1* و *i2* تقسیم می‌شود. منطقه *i* نقش عملکردی در فعالیت ایجاد واکوئول بازی می‌کند. دو زیرگروه برای ناحیه *i* وجود دارد، *i1* و *i2*.[2] با توجه به اینکه در سویه‌های مختلف هلیکوباکترپیلوری تنوع ژنومی وجود داشته و از طرفی فراوانی ژن‌های بیماری‌زای این باکتری از نقاط مختلف جهان گزارش شده است، از این‌رو بر آن شدیم تا فراوانی آلل‌های *i1* و *i2* ژن *vacA* را در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های امام‌رضا (ع) و شهید مدنی تبریز و ارتباط آلل *i1* را با سرطان معده، به‌عنوان یک پیشگوی سرطان معده بررسی کنیم.

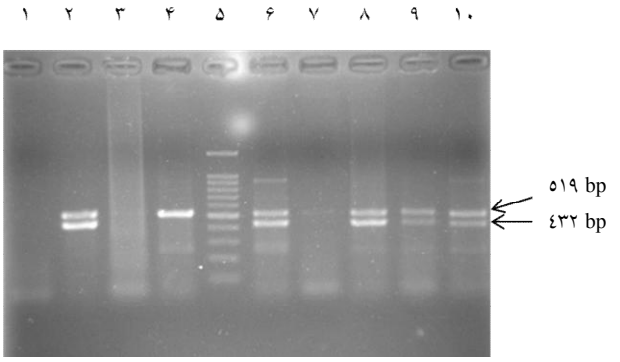
روش بررسی

در این مطالعه که از نوع مقطعی بود، ۸۹ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند که نسبت مرد به زن در این بیماران ۱/۰۲ (۴۵/۴۴) بود. بر اساس تشخیص آندوسکوپی و تست پاتولوژی ۴۸ مورد از این بیماران مبتلا به گاستریت، ۱۷ مورد مبتلا به زخم گوارشی (Peptic ulcer) و ۲۴ بیمار مبتلا به سرطان معده بودند. نمونه‌ها از شهریورماه سال ۱۳۹۱ تا خردادماه سال ۱۳۹۲ از بیمارستان‌های امام‌رضا و شهید مدنی تبریز

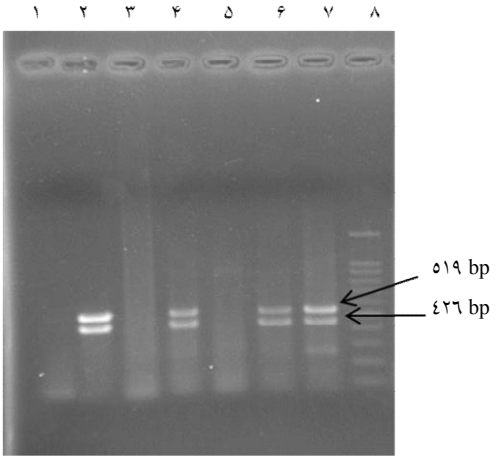
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-28]

جدول ۱: توالی پرایمرها و اندازه محصولات PCR

نام آلل و پرایمرها	توالی هر پرایمر	اندازه محصولات PCR
***vacA i* region**		
i1		
vac-F1	5′-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3′	٤٢٦ bp
C1R	5′-TTAATTTAACGCTGTTTGAAG'-3′	
i2		
vac-F1	5′-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3′	٤٣٢ bp
C2R	5′-GATCAACGCTCTGATTTGA-3′	
16S rDNA		
HP1	5′-GCAATCAGCGTCAGTAATGTTC-3′	٥١٩ bp
HP2	5′-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3′	



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR آلل *i2*. چاهک‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب مربوط به کنترل‌های منفی و مثبت، چاهک ۳ مربوط به نمونه هلیکوباکترپیلوری- منفی، چاهک ٤ مربوط به نمونه فاقد آلل *i2*، چاهک‌های ٦، ٨، ٩، ١٠ مربوط به نمونه‌های دارای *i2* می‌باشند. چاهک ٥ مربوط به سایز مارکر ١٠٠ جفت بازی است. وزن قطعه ژنی *i2* ٤٣٢ جفت باز است و وزن قطعه ژنی مربوط به *16S rDNA* به‌عنوان کنترل داخلی، ٥١٩ جفت باز می‌باشد.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR آلل *i1* چاهک‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب مربوط به کنترل‌های منفی و مثبت، چاهک ۳ و ۵ مربوط به نمونه هلیکوباکترپیلوری- منفی، چاهک‌های ٤، ٦، و ٧ مربوط به نمونه‌های دارای آلل *i1* می‌باشند. چاهک ٨ مربوط به سایز مارکر ١٠٠ جفت بازی است. وزن قطعه ژنی *i1* ٤٢٦ جفت باز است و وزن قطعه ژنی مربوط به *16S rDNA* به‌عنوان کنترل داخلی، ٥١٩ جفت باز می‌باشد.

جمع‌آوری شدند. دو نمونه بیوپسی توسط پزشک متخصص طی آندوسکوپی از بخش آنتروم معده بیماران برداشته شد. یکی از این نمونه‌ها در ظرف حاوی محلول آزمایش اوره‌آز قرار داده شد و نمونه دیگر در میکروتیوپ ۱/۵ میکرولیتری استریل قرار داده شده و جهت آزمایشات آینده به فریزر °C ۷۰- منتقل گردید.

استخراج DNA و PCR: استخراج DNA هلیکوباکترپیلوری با استفاده از کیت استخراج DNG^{TM} Plus kit (CinnaGen, Tehran, Iran) DNA و بر اساس دستورکار آن از نمونه‌های آلوده به هلیکوباکترپیلوری انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهایی که در جدول ۱ آمده، انجام شد.

حجم کل محلول PCR، ۲۵ µl بود که حاوی ۱۲/۵ µl از کیت PCR (Master mix) (CinnaGen, Tehran, Iran)، ۵ µl از DNA استخراج شده، ۱ µl از هر پرایمر رفت و برگشت، ۰/۵ µl از پرایمر *16S rDNA* به‌عنوان کنترل داخلی بود. دستگاه Thermal Cycler

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-28]

(Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) بود. الکتروفورز محصولات PCR روی آگارز ۱/۲٪ و با استفاده از بافر TAE انجام شد. Size marker مورد استفاده ۱۰۰ جفت باز (100bp) بود. ژل آگارز پس از الکتروفورز محصولات در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد و پس از رنگ‌آمیزی DNA، باندهای تشکیل شده با استفاده از UV transilluminator (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK) مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل مثبت از سویه‌های هلیکوباکترپیلوری استان‌های ساری و گیلان به‌دست‌آمده بود (DNA استخراج شده از نمونه‌های کشت‌شده). تصاویر مربوط به الکتروفورز محصولات PCR در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است.

از آنالیز χ^2 و Fisher's exact test در SPSS ویراست ۱۹ استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. رگرسیون چندگانه لجستیک برای بررسی تاثیر هر آلل در خطر بروز سرطان معده و سایر بیماری‌های گوارشی به‌کار برده شد. بیماران مبتلا به گاستریت در همه آنالیزهای مقایسه‌ای به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

فراوانی کلی آلل *i1* ۵۱/۶۸٪ بود که فراوانی این آلل در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان معده به‌ترتیب: (۱۹/۴۸) ۳۹/۵۸٪، (۶/۱۷) ۳۵/۲۹٪ و (۲۱/۲۴) ۸۷/۵٪ بود. فراوانی کلی آلل *i2* هم ۴۸/۳۱٪ بود که فراوانی این آلل در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان معده به‌ترتیب (۲۹/۴۸) ۶۰/۴۲٪، (۱۱/۱۷) ۶۴/۷٪ و (۳/۲۴) ۱۴/۲۸٪ به‌دست آمد.

در این مطالعه نشان داده شد که فراوانی آلل *i1* در مقایسه با آلل *i2* در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از افراد مبتلا به سرطان معده [۲۱/۲۴ (۸۷/۵٪)] بسیار بیشتر از بیماران مبتلا به گاستریت [۱۹/۴۸ (۳۹/۵۸٪)] بود (P=۰).

تأثیر ژنوتیپ آلل‌های *vacA* در ایجاد سرطان و زخم معده: در این مطالعه آنالیز رگرسیون چندگانه خطی برای ۸۹ بیمار ارتباط شدید بین آلل *i1* و سرطان معده (P<۰/۰۰۱)؛ ۰/۵۱۱±۰/۰۸۴ Partial regression correlation را تایید کرد. نتایج آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک نشان داد که ژنوتیپ ناحیه *vacA i1* به‌طور معناداری با سرطان معده در ارتباط بود (P=۰/۰۰۱؛ ۴۵۰/۹۳۴–۴/۹۲۸، ۹۵٪CI؛ Odds Ratio, OR)= ۴۷/۴۲۷). آنالیزهای آماری ارتباط معناداری را بین آلل‌های ناحیه *i* ژن *vacA* و خطر بروز زخم معده نشان نداد.

بحث

ژن *vacA* از دو بخش توالی نشانه (*s*) و بخش میانی (*m*) تشکیل شده است. به‌تازگی یک منطقه حدواسط *i* شناسایی شده که در بین نواحی *s* و *m* قرار گرفته و دو زیرگروه برای ناحیه *i* وجود دارد، *i1* و *i2*. سویه‌های *vacA i1* واکوئول‌زا هستند و سویه‌های *vacA i2* توانایی ایجاد واکوئول را ندارند. در یک مطالعه که بر روی ۷۳ بیمار ایرانی آلوده به هلیکوباکترپیلوری صورت گرفت، آلودگی با سویه‌های *i1 vacA* به‌طور قوی با سرطان معده مرتبط است.[۲] در مطالعه‌ای که بر روی سویه‌های ایرانی و عراقی جدا شده از افراد مبتلا به زخم معده صورت گرفت، ژنوتیپ *vacA i1* تنها با زخم معده در عراق ارتباط معناداری نشان داد.[۳]

مطالعه Sheu عدم ارتباط بین *vacA i* با عوارض مختلف دستگاه گوارش را نشان داد.[۴] Basso در پژوهش خود نشان داد که ارتباط معناداری بین *i1* به‌تنهایی با زخم معده وجود دارد.[۵] Yakoob و همکاران ارتباط معناداری بین ژنوتیپ *i1* با سرطان معده، زخم معده و دوازدهه مشاهده کردند.[۶] در مطالعه اپیدمیولوژیکی که توسط Jang و همکاران بر روی ۲۲۵ سویه کره جنوبی در مورد ارتباط پلی‌مورفیسم‌های *vacA* و *cagA* با سرطان معده انجام گرفته، *i1* به‌عنوان تعیین‌کننده‌ی اصلی وضعیت بیماری شناخته نشده است.[۷] Lui و همکارانش به نتایج مشابهی در مورد عدم ارتباط آلل *i1* با عوارض مختلف دستگاه گوارش دست یافتند.[۸]

در مطالعه Karlsson درباره ارتباط ژنوتیپ‌های *vacA* با پاتوژنز معده و دوازدهه، هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ *vacA i1* به‌تنهایی یا به‌صورت ترکیبی (با آلل‌های *s* و *m*) با پاتوژنز معده مشاهده نشد.[۹]

Latifi-Navid و همکارانش ژنوتیپ‌های *vacA d1/-i1* را بین مناطق با شیوع پایین و شیوع بالای سرطان معده در ایران بررسی کرده و ۱۳۸ سویه هلیکوباکترپیلوری را از ۱۰ منطقه کشور برای تیپ‌بندی مورد استفاده قرار دادند. آنها پیشنهاد کردند که ژنوتیپ‌های

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-28]

vacA d1/-i1 تعیین‌کننده‌های جدید سرطان معده بوده و پتانسیل بیشتری برای تمایز سویه‌های هلیکوباکترپیلوری بین مناطق با شیوع بالا و پایین سرطان معده در ایران دارند.[10] این مطالعات نشان می‌دهد که ممکن است آلل *i1* در ایران به‌عنوان پیشگوی سرطان معده باشد، اما با توجه به تنوع سویه‌ای هلیکوباکترپیلوری و متفاوت بودن فراوانی این ژن در نقاط مختلف جهان، مفید بودن *i1* در پیشگویی عوارض مختلف گوارشی بستگی به منشأ جغرافیایی سویه‌ها دارد و همچنین ممکن است ژنوتیپ‌های دیگر این باکتری و عوامل مربوط به میزبان و فاکتورهای محیطی در بروز عوارض مختلف دستگاه گوارش مؤثر باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که در منطقه آذربایجان شرقی، آلل *i1* ژن *vacA* با سرطان معده در ارتباط هست و می‌توان آنرا به‌عنوان یک پیشگویی‌کننده سرطان معده معرفی کرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی‌از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی ارتباط آلل‌های *babA2* و *i1/i2* ژن *vacA* هلیکوباکترپیلوری با آدنوکارسینومای معده" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۲-۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه تبریز اجرا شده است.

References

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1(8390):1311-5.
2. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133(3):926-36.
3. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in virulence markers between Helicobacter pylori strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in H. pylori-associated disease. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1774-9.
4. Sheu SM, Hung KH, Sheu BS, Yang HB, Wu JJ. Association of nonsynonymous substitutions in the intermediate region of the vacA gene of Helicobacter pylori with gastric diseases in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2009;47(1):249-51.
5. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135(1):91-9.
6. Yakoob J, Abid S, Abbas Z, Jafri W, Ahmad Z, Ahmed R, et al. Distribution of Helicobacter pylori virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. *BMC Gastroenterol* 2009;9:87.
7. Jang S, Jones KR, Olsen CH, Joo YM, Yoo YJ, Chung IS, et al. Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA. *J Clin Microbiol* 2010;48(2):559-67.
8. Lui SY, Chuah SW, Goh HL, Lee KY, Lee VS, Ho B, et al. Different cagA and vacA polymorphisms are found in the Chinese versus the Malay and Indian populations: An analysis of Helicobacter pylori virulence genes in Singapore. *Proceed Singapore Healthcare* 2010;10(1):12-8.
9. Karlsson A, Ryberg A, Nosouhi Dehnoei M, Borch K, Monstein HJ. Association between cagA and vacA genotypes and pathogenesis in a Helicobacter pylori infected population from South-eastern Sweden. *BMC Microbiol* 2012;12:129.
10. Latifi-Navid S, Mohammadi S, Maleki P, Zahri S, Yazdanbod A, Siavoshi F, et al. Helicobacter pylori vacA d1/-i1 genotypes and geographic differentiation between high and low incidence areas of gastric cancer in Iran. *Arch Iran Med* 2013;16(6):330-7.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-28]

TUMJ Tehran University Medical Journal, December 2014; Vol. 72, No. 9: 638-642 Brief Report

Relationship of *Helicobacter pylori vacA i1* and *i2* alleles with gastric cancer risk, Iran: *a brief report*

Batool Mottaghi M.Sc.[1]
Reza Safaralizadeh Ph.D.[1*]
Morteza Jabbarpour Bonyadi Ph.D.[1]
Saeid Latifi-Navid Ph.D.[2]
Mohammad Hossien Somi M.D.[3]
Majid Mahdavi Ph.D.[1]

1- Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3- Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

[*] Corresponding author: Dept. of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, 29 Bahman Blvd., Tabriz, Iran.
Tel: +98-41-33392694
E-mail: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir

Abstract

Received: 16 Apr. 2014 Accepted: 27 Oct. 2014 Available online: 11 Dec. 2014

Background: *Helicobacter pylori vacA* (vacuolating toxin A) gene is comprised of mid- (*m*), intermediate- (*i*) and signal-regions. Recently, the *vacA-i* region genotype has been suggested to be a better predictor of disease severity than either the *s*- or *m*-region. The main aim of the present study was to determine the associations of *i* region polymorphisms of *vacA* gene with gastric cancer (GC) and peptic ulcer disease (PUD) in Azerbaijan Province patients.

Methods: A number of 89 patients were enrolled. The biopsy samples were taken from patients referring to the endoscopy units of Imam Reza and Shahid Madani Hospitals, Tabriz, Iran from August 2012 to May 2013. The genotype frequencies of *vacA-i1* and *i2* in were studied using polymerase chain reaction (PCR).

Results: The frequency of *vacA-i1* and *i2* was 51.68% and 48.31%, respectively. The genotypic frequency of *vacA-i1* in patients with GC (21/24, 87.5%) was significantly higher than in those with non-atrophic gastritis, NAG (19/48, 39.58%). In contrast, the genotypic frequency of *vacA-i2* in patients with NAG, PUD, and GC was 60.42%, 64.70%, and 14.28%, respectively. The results of multiple linear and logistic regression analyses confirmed the intensity of correlation of *vacA-i1* allele with GC compared with control group (NAG). No significant correlation was found between the *vacA-i*-region alleles and PUD risk.

Conclusion: We have proposed that the *H. pylori vacA-i1* genotype could be an important biomarker for predicting the gastric cancer risk in Azerbaijan Province in Iran. However, due to the difference in the allelic frequency of this gene in *H. pylori* strains from different parts of the world, the *vacA-i1* genotype usefulness in predicting the gastrointestinal diseases is dependent to the geographic origin of the strains.

Keywords: Alleles, *Helicobacter pylori*, stomach neoplasms, VacA protein.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-28]