

تأثیر پلی مورفیسم Asp299Gly ژن TLR4 بر بیان IL-6 و IL-18 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری

قربانعلی رحیمیان^۱، نادر باقری^۲، ابوالفضل قلی پور^۳، هدایت الله شیرزاد^{۴*}

خلاصه

مقدمه: هلیکوباکتریلوری با زخم گوارشی و سرطان معده همراه می‌باشد. پلی مورفیسم در ژن‌های کد کننده گیرنده‌های شبه تول ممکن است بر پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی مؤثر بوده و در استعداد ابتلا به هلیکوباکتریلوری و نتایج بیماری تأثیر داشته باشند. اما جزئیات و همراهی پلی مورفیسم‌های مختلف و نتایج بالینی متفاوت در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری هنوز نامشخص است. هدف از این مطالعه تأثیر پلی مورفیسم Asp299Gly TLR-4 بر بیان سایتوکاین‌های اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری در مقایسه با بیماران غیر آلوده می‌باشد.

روش: در این مطالعه موردی-شاهدی، از ۵۸ بیمار آلوده به هلیکوباکتریلوری و ۴۴ بیمار غیر آلوده بیوپسی جمع آوری شد. ژنوتیپ پلی مورفیسم نقطه‌ای TLR-4 Asp299Gly به روش PCR-RFLP بررسی شد. سطح بیان mRNA مخاطی سایتوکاین‌های اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ توسط real-time PCR اندازه گیری شد. بیان سایتوکاین‌ها در دو گروه آلوده و غیر آلوده با استفاده از t-Test مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های D/G و D/D در گروه بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری و بیماران غیر آلوده به ترتیب ۵۵/۲، ۴۴/۸ و ۷۷/۲ درصد بود. سطح بیان اینترلوکین-۶ در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به هلیکوباکتریلوری با پلی مورفیسم در ژن TLR-4 به طور معنی داری افزایش داشت (P=۰/۰۰۱). ولی ارتباط معنی داری بین سطح بیان اینترلوکین-۱۸ و پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری دیده نشد (P=۰/۴۱۹). به علاوه ارتباط معنی داری بین سطح بیان اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۸ و پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: پلی مورفیسم نقطه‌ای در ژن TLR-4 باعث افزایش بیان ژن سایتوکاین اینترلوکین-۶ می‌شود و افزایش این سایتوکاین التهابی ممکن است نقش مهمی در ایجاد التهاب معده همراه با هلیکوباکتریلوری داشته باشد. واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتریلوری، پلی مورفیسم، اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۸، گیرنده شبه تول شماره ۴، التهاب معده

۱- استادیار گروه داخلی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۲- دانشجوی دکتری ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران ۳- استادیار گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۴- استاد گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: shirzad1951@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۹

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۷/۱۳

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۵

مقدمه

باکتری هلیکوباکتریپیلوری به عنوان علت معمول در ابتلا به گاستریت مزمن شناخته شده است. این باکتری به عنوان یک عامل بیماری‌زای مهم در ایجاد التهاب معده، زخم معده و دئودنوم نام برده می‌شود (۴-۱). این باکتری حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است (۵۶). پذیرنده‌های شبه Toll (TLR) یک گروه از پروتئین‌های گیرنده متصل به غشاء هستند که در پاسخ‌های ایمنی ذاتی مشارکت دارند و تا کنون ۱۱ عضو آنها شناسائی شده است. پذیرنده‌های TLRها که بر سطح سلول‌های اپیتلیال معده و سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته در مخاط معده بیان شده و به عنوان خط اول دفاعی میزبان بر علیه هلیکوباکتریپیلوری شناخته شده‌اند. در چندین مطالعه اثرات متناقضی در رابطه با TLR-4 در فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی بر علیه هلیکوباکتریپیلوری گزارش شده است (۷، ۸). موتاسیون‌های TLR-4 باعث کاهش شناسائی LPS هلیکوباکتریپیلوری و همچنین کاهش فعال‌سازی NF-kB درون سلولی و به علاوه کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی مختلف می‌گردد و فرد را مستعد ابتلا به فرم‌های خاصی از بیماری می‌نماید (۹). ژن TLR-4 شامل ۳ اگزون بوده و بر روی کروموزوم 33-9q قرار دارد. مطالعات نشان می‌دهد که تاکنون دو جایگاه پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) غیر مترادف شامل A896G (rs4986790) و C1196T (rs4986791) در اگزون شماره ۳ ژن TLR-4 شناسائی شده است که به ترتیب منجر به جایگزینی آسپارتیک اسید شماره ۲۹۹ به گلاسین و تره‌ئونین ۳۹۹ به ایزولوسین می‌شود. جایگزینی اسید آمینه آسپارتیک اسید به جای اسید آمینه گلیسین در موقعیت ۲۹۹ از توالی آمینواسید (D299G) در اثر تبدیل A-G در جفت باز ۸۹۶

صورت می‌گردد (۱۰). IL-6 یک سایتوکاین با خاصیت چند عملکردی می‌باشد، که توسط سلول‌های ایمنی و غیرایمنی تولید می‌شود و نقش آن به عنوان یک واسطه التهابی و آندوکرینی و تنظیم‌گر عملکردی متابولیسمی می‌باشد (۱۱). مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که بیان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 در افراد آلوده به هلیکوباکتریپیلوری در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین افزایش بیان این سایتوکاین‌ها در افراد به هلیکوباکتریپیلوری باعث تشدید التهاب معده می‌شود (۱۲، ۱۳). IL-18 با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و افزایش پاسخ سلول‌های Th1 در دفاع بر علیه عفونت هلیکوباکتریپیلوری نقش مهمی بازی می‌کند (۱۴). با توجه به میزان بالای بیماران با مشکلات معده‌ای - روده‌ای در استان چهارمحال و بختیاری که ممکن است آنان را مستعد ابتلا به سرطان معده نماید، به نظر می‌رسد که از اطلاعات به دست آمده در رابطه با وضعیت ژنوتیپی بیماران به لحاظ پلی مورفیسم ژن‌های TLR-4 و ارتباط آنها با بیان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18، بتوان جهت پیشگیری بیماران استفاده و نسبت به اقدامات پیشگیرانه معمول یا شناسائی بیماری در مراحل اولیه اقدام نمود. توسعه مطالعات در این زمینه، از طریق افزایش دانسته‌های ما در رابطه با مکانیسم بیماری‌زایی هلیکوباکتریپیلوری ممکن است به پیدا کردن راهکارهای مناسب درمانی کمک کند.

روش انجام آزمایش

نمونه‌گیری

در این مطالعه مورد-شاهدی، از ۱۰۲ بیمار دارای مشکلات معده‌ای - روده‌ای مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد (نمونه‌گیری در دسترس) به

فوراً به فریز ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد و نهایتاً به کمک محلول نامبرده، Total RNA از بافت بیوپسی استخراج گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان Total RNA اندازه گیری و سپس ۳ μ l از total RNA را با استفاده از کیت Revertaid First cDNA synthesis (#K1632, Fermentase) طبق روش مندرج در برشور شرکت سازنده کیت به cDNA تبدیل شد. پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. و تمام واکنش‌های real-time PCR در دستگاه Rotor Gene TM 3000 (Corbett) انجام گردید. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول که منجر به واسرشتگی (Denaturation) مولکول‌های cDNA می‌شود، 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. این واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ μ l در میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی لیتری انجام گردید. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲ μ l از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۴ μ l از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ pm و ۰/۲ μ l از پروب با غلظت ۱۰ pm، ۷ μ l آب RNase /DNase free و ۲ μ l cDNA به عنوان الگو استفاده و سپس نمونه مورد نظر در دستگاه قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده و β -actin به عنوان ژن رفرانس در نظر گرفته شد.

روش آندوسکوپی از قسمت انتهایی معده بیوپسی گرفته شد. گروه‌ها شامل: گروه هلیکوباکتریلوری مثبت دارای التهاب معده به تعداد ۵۸ نفر (۲۳ مرد و ۳۵ زن) با میانگین سن $41/41 \pm 15/71$ و گروه هلیکوباکتریلوری منفی به تعداد ۴۴ نفر (۲۰ مرد و ۲۴ زن) با میانگین سنی $16/69 \pm 38/14$ بودند. بیماران که در دو ماه اخیر عوامل ضد ترشچی، 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. تشخیص هلیکوباکتریلوری بر اساس تست اوره‌آز سریع و تهیه لام رنگ آمیزی شده از بیوپسی برای تشخیص باکتری در بافت معده و تعیین درجه التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه‌بندی شدند (۱۵). بیماران که تست‌های اوره‌آز و پاتولوژی آنها از لحاظ تشخیص هلیکوباکتریلوری مثبت باشد در گروه افراد آلوده و آنهایی که هر دو تست منفی باشند در گروه غیر آلوده قرار گرفتند. بیماران که یکی از تست‌های نام برده مثبت و تست دیگر منفی باشد، در این مطالعه وارد نشدند. این طرح مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد قرار گرفت و از کلیه بیماران جهت ورود رضایت نامه کتبی اخذ گردید.

استخراج RNA و تهیه cDNA

به منظور پایدار کردن mRNA یکی از بیوپسی‌ها بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در محلول Biozol قرار گرفت و

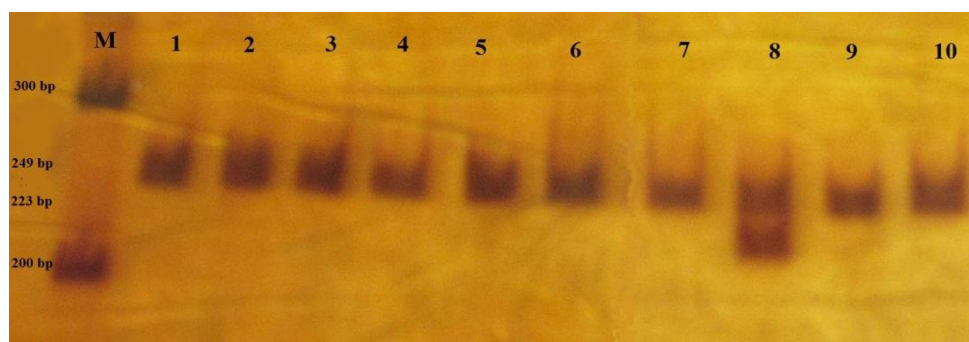
جدول ۱. توالی پرایمرها و پروبهای بکار رفته در این مطالعه

ژن‌ها	توالی پرایمرها و پروبها
β -actin	Forward 5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3
	Reverse 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3
	Probe FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA
IL-6	Forward 5- GGTACATCCTCGACGGCATCT-3
	Reverse 5- GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC-3
	FAM-TGTTACTCTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGCT- Probe TAMRA
IL-18	Forward 5-GACCAAGGAAATCGGCCTCTA-3
	Reverse 5 CCATACCTCTAGGCTGGCTATCTT-3
	Probe FAM- ATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGAC-TAMRA

روش PCR (PC818-Japan) انجام شد. برنامه PCR، شامل ۳۵ سیکل با برنامه ۱۰ دقیقه ۹۵ درجه، ۱ دقیقه ۹۵ درجه، ۱ دقیقه ۶۵ درجه، و ۱ دقیقه ۷۲ درجه و ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه بود. بعد از انجام PCR، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه‌ها روی ژل ۸ درصد اکریل آمید الکتروفورز گردیدند، سپس باقیمانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت ۳ ساعت در مجاورت آنزیم NcoI گرفت. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات مجدداً روی آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند. باندهای مشاهده شامل: سه باند ۲۴۹ bp، ۲۲۳ bp و ۲۶ bp که نشان دهنده نوع هتروزیگوت (D/G)، تک باند ۲۴۹ bp نشان دهنده هموزیگوت طبیعی (D/D) و دو باند ۲۲۳ bp و ۲۶ bp نشان دهنده هموزیگوت موتانت (GG) بود. (شکل ۱).

روش Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

در این مطالعه از روش PCR-RFLP برای شناسایی پلی مورفیسم TLR-4 Asp299Gly استفاده گردید. پرایمرهای پیش برنیده 5- GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3 و پرایمر معکوس 5- GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3 برای تکثیر قطعه ۲۴۹ bp استفاده شدند (۱۷). هر میکروتیوپ PCR حاوی ۱ μ l از هر یک از دو آغازگر F و R با غلظت ۵۰ pm، ۰/۵ μ l آنزیم Taq پلی مرز (۵ unit/ μ l)، ۰/۵ μ l مخلوط دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۱۰ mM، ۲ μ l بافر PCR (۱۰X)، ۲ μ l از MgCl₂ (۵۰ mM) و ۳ μ l از DNA (۱۰۰ ngr) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ μ l رسید. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر، ASTEC



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR-RFLP به منظور بررسی حضور پلی مورفیسم در ژن *TLR4*. همان گونه که مشاهده می شود نمونه ۸ دارای ژنوتیپ *D/G* و بقیه نمونه ها دارای ژنوتیپ *D/D* می باشند. (لازم به ذکر است به خاطر کوچک بودن قطعه ۲۶ bp، این قطعه از ژل الکتروفورز خارج شده و قابل شناسایی نبود)

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 ۱۶ استفاده گردید. برای بررسی ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین های *IL-6* و *IL-18* با پلی مورفیسم در ژن *TLR-4* از آزمون آماری t-test استفاده و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

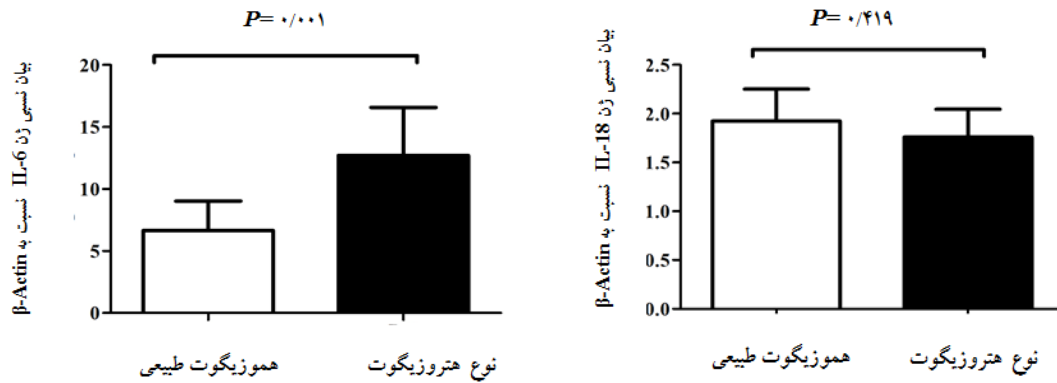
نتایج به دست آمده از PCR-RFLP فراوانی ژنوتیپ های *D/D* و *D/G* در گروه بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری و گروه غیر آلوده به ترتیب ۵۵/۲، ۴۴/۸ و در گروه غیر آلوده ۷۷/۲ و ۲۲/۸ بود (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ های مختلف *TLR4* در گروه آلوده و غیر آلوده

ژنوتیپ <i>TLR4</i>	غیر آلوده به هلیکوباکتر پیلوری	آلوده به هلیکوباکتر پیلوری
<i>D/D</i>	۳۴ (۷۷/۲)	۳۲ (۵۵/۲)
<i>D/G</i>	۱۰ (۲۲/۸)	۲۶ (۴۴/۸)
<i>G/G</i>	۰	۰
کل	۴۴ (۱۰۰)	۵۸ (۱۰۰)

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن سایتوکاین *IL-6* در نمونه های بیوپسی بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری با پلی مورفیسم *TLR-4* نوع هتروزیگوت (*D/G*) در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری با نوع هموزیگوت طبیعی (*D/D*) به طور معنی داری بیشتر بود

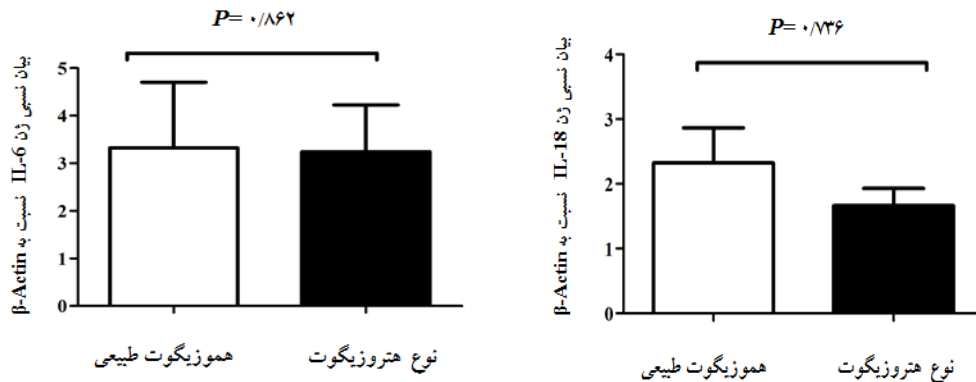
($P=0/001$). اما ارتباط معنی داری در بیان ژن سایتوکاین *IL-18* با وجود یا عدم وجود پلی مورفیسم در ژن *TLR-4* در بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری دیده نشد ($P=0/419$) (شکل ۲).



شکل ۲. ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران آلوده به عفونت هلیکوباکتریلوری

وجود پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری وجود ندارد (شکل ۳).

مطالعه ما همچنین نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با وجود یا عدم



شکل ۳. ارتباط سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیر آلوده به عفونت هلیکوباکتریلوری

بحث و نتیجه‌گیری

سایتوکاین IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی مورفیسم در بیماران آلوده دیده نشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان ژن سایتوکاین‌های IL-6 و IL-18 با وجود یا عدم وجود پلی مورفیسم در ژن TLR-4 در بیماران غیر آلوده به هلیکوباکتریلوری وجود ندارد. مطالعه Bagheri و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که هیچ ارتباطی بین وجود یا عدم وجود پلی مورفیسم در ژن

هلیکوباکتریلوری در رده اول عوامل عفونی ایجادکننده سرطان دستگاه گوارش قرار دارد (۲۰-۱۸، ۵). نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن سایتوکاین IL-6 در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به هلیکوباکتریلوری با نوع هتروزیگوت (D/G) در مقایسه با بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری با نوع هموزیگوت طبیعی (D/D) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، اما ارتباط معنی‌داری در بیان ژن

در رابطه با ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 در هیچ کدام از ۳ گروه نشان دهد (۲۴). در مطالعه B.R. Achyut و همکاران در سال ۲۰۰۷ در هند نشان داده شد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 در بیماران نسبت به کنترل بیشتر بود و این افراد ۲/۵ برابر ریسک بالاتری برای ابتلا به گاستریت داشته‌اند (۲۵). در مطالعه Garza-Gonzalez1 و همکاران که در سال ۲۰۰۷ در رابطه با ارتباط پلی مورفیسم TLR-4 D299G با سرطان معده صورت گرفت نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری در فراوانی ژنوتیپ‌های D/D و D/G در بین بیماران دارای سرطان معده و گروه کنترل وجود ندارد (۲۶). همچنین مطالعه Tahara T و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی بیماران ژاپنی دارای سرطان معده صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که ارتباط معنی داری بین استعداد ابتلا به سرطان معده و پلی مورفیسم TLR-4 D299G در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (۲۷). مطالعه Kato I و همکاران در سال ۲۰۰۵ که بر روی مراحل مختلف زخم‌های پیش سرطانی معده و پلی مورفیسم TLR-4 D299G در جمعیت ونزوایی صورت گرفت به این نتیجه رسیدند که ولی ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم TLR-4 D299G و زخم‌های پیش سرطانی وجود ندارد، تنها افزایش خفیف غیر معنی داری در ریسک ابتلا به متاپلازیایی روده‌ای دیده شد که در شرایط D/D، میزان هلیکوباکتریلوری بافتی بیشتری وجود داشت (۲۸).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پلی مورفیسم نقطه‌ای D299G در ژن TLR-4 باعث افزایش بیان ژن سایتوکاین IL-6 می‌شود و افزایش بیان این سایتوکاین التهابی ممکن است نقش مهمی در ایجاد التهاب معده همراه با

TLR-4 در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری و بیماران غیر آلوده وجود ندارد. اما درجه التهاب مونونوکلئر در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری با ژنوتیپ D/G نسبت به بیماران آلوده با نوع ژنوتیپ D/D به طور معنی داری بیشتری بود (۱۷). مطالعه Alejandra و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جمعیت بیماران مکزیکي صورت گرفت نشان داد نشان که پلی مورفیسم TLR-4 D299G به میزان ۵۲ درصد در افراد آلوده به هلیکوباکتریلوری وجود دارد و در این رابطه پلی مورفیسم TLR-4 D299G در بیماران دارای زخم روده و کسانی که مستعد سرطان معده هستند در مقایسه با بیماران دارای التهاب معده غیر آتروفی بیشتر دیده شد. همچنین بیان سایتوکاین‌های IL-1 β ، IL-8 و GRO- α در افراد آلوده با فرم پلی مورفیسم D/G به طور معنی نسبت به بیماران با ژنوتیپ D/D پایین تر می‌باشد و بیان سایتوکاین‌های TNF- α ، IL-10، MCP-1 و MIP-1 α در افراد آلوده با پلی مورفیسم D/G به طور معنی نسبت به بیماران با ژنوتیپ D/D بالاتر می‌باشد (۲۱). در مطالعات بسیاری که اخیراً در کشورهای مختلف بر روی بیماران آلوده هلیکوباکتریلوری انجام پذیرفته، ارتباط پلی مورفیسم ژن TLR-4 را با بیماری‌های معده‌ای - روده‌ای گزارش کرده‌اند. در مطالعه Hellmig S و همکاران نشان داد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 به صورت معنی داری در بیماران با لنفومای مخاطی معده نسبت به گروه کنترل مبتلا به هلیکوباکتریلوری به میزان کمتری وجود داشت (۲۲). همچنین مطالعه Hold GL و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ژنوتیپ D/G در ژن TLR-4 با سرطان معده‌ای غیر کاردیا و شرایط پیش سرطانی این ناحیه ارتباط داشته است (۲۳). در مطالعه Wu MS و همکاران در سال ۲۰۰۶ در چین بر روی بیماران لنفومای اولیه معده و سرطان معده در مقایسه با گروه کنترل نتوانست ارتباطی را

سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر استان چهارمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، جهت تأمین بودجه و تصویب این طرح با شماره ۱۵۵۴ و نیز از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را داریم.

هلیکوباکتریپیلوری داشته باشد. بیان بالای این سایتوکاین ممکن است در تشدید التهاب معده در بیماران آلوده نقش اصلی داشته باشد. پس به همین دلیل می‌طلبد تا مطالعات بیشتری بر روی وجود سلول‌های مختلف سیستم ایمنی در بیماران آلوده با هلیکوباکتریپیلوری در مقایسه با گروه کنترل انجام گیرد تا نقش دقیق این سلول‌ها و سایتوکاین‌های که از این سلول‌ها ترشح می‌شوند در بروز بیماری و در تعیین پیش‌آگهی و ارزیابی برنامه‌های درمانی بیشتر مشخص شود.

References

1. 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.
2. 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. *Microb pathog* 2015; 80: 67-72.
3. 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): 61-7.
4. 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 Pathogen* 2015; 81: 33-8.
5. Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009; 44(4):239-48.
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):212-8.
7. Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(35): 32552-60.
8. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, et al. Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate

- immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2004;72(11): 6446-54.
9. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, et al. Distinct mechanism of Helicobacter pylori-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 44856-64.
 10. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(2): 588-93.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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. *J Microb Pathogen* 2013; 65: 7-13.
 14. Bagheri N, Rahimian G, Salimzadeh L, Taghikhani A, Mahsa M, Hashemzadeh M, et al. Expression of IL-18 cytokine mRNA in gastric mucosa tissue of patients with H. pylori infection in Chahar Mahal and Bakhtiari. *ISMJ* 2014; 17(4): 533-41 [In Persian].
 15. Manxhuka-Kerliu S, Telaku S, Devolli-Disha E, Ahmetaj H, Sahatciu-Meka V, Kerliu A, et al. Helicobacter pylori gastritis updated Sydney classification applied in our material. *Macedonian Academy of Sciences and Arts, Section of Biological and Medical Sciences* 2009; 30(1): 45-60.
 16. 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.
 17. 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): 366-71.
 18. 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): 2107-18.
 19. Zandi F, Shirzad H, Bagheri N, Ahmadi A, Azadegan F, Gharib A, et al. Evaluation of IL-17A and IL-17F genes polymorphism in Iranian dyspeptic

- patients. *Life Science Journal* 2013; 10(12s):544-51.
20. Menbari MN, Rahmani SA, Ahmadi A, Zandi F, Bagheri N, Jalili A, et al. Evaluation of E-cadherin (CDH1) gene polymorphism related to gastric cancer in Kurdish population. *Life Science Journal* 2013; 10(12s): 212-6.
 21. Trejo-de la OA, Torres J, Perez-Rodriguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, et al. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol* 2008; 129(2): 333-40.
 22. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Folsch UR, Hampe J, Schreiber S. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(6): 869-72.
 23. Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology* 2007; 132(3): 905-12.
 24. Wu MS, Cheng TY, Shun CT, Lin MT, Chen LC, Lin JT. Functional polymorphisms of CD14 and toll-like receptor 4 in Taiwanese Chinese with Helicobacter pylori-related gastric malignancies. *Hepatogastroenterology* 2006; 53(71): 807-10.
 25. Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol* 2007; 68(11): 901-7.
 26. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 - 251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007; 7: 70.
 27. Tahara T, Shibata T, Hirata I, Nakano H, Arisawa T. CD14 promoter-159 polymorphism is associated with reduced risk of intestinal-type gastric cancer in a Japanese population. *Dig Dis Sci* 2009; 54(7): 1508-12.
 28. Kato I, Canzian F, Plummer M, Franceschi S, van Doorn LJ, Vivas J, et al. Polymorphisms in genes related to bacterial lipopolysaccharide/peptidoglycan signaling and gastric precancerous lesions in a population at high risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2007; 52(1): 254-61.

The Effect of TLR4 Asp299Gly polymorphism on IL-6 and IL -18 expression in *H.pylori* infected patients

Ghorbanali Rahimian, M.D.¹, Nader Bagheri, Ph.D.², Abolfazl Gholipour, Ph.D.³,
Hedayatollah Shirzad, Ph.D.^{4*}

1. Assistant Professor, Department of Internal Medicine & Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2. Ph.D. Student in Immunology, Department of Immunology, School of Public Health & Immunology Research Center, Tehran University of Medical, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine & Cellular and Molecular Research center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
4. Professor, Faculty of Medicine & Cellular and Molecular Research center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; e-mail: shirzad1951@yahoo.com

(Received: 5 July 2015 Accepted: 29 Dec. 2015)

Abstract

Background & Aims: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is associated with peptic ulcer and gastric cancer. Polymorphisms of the genes coding Toll-like receptors (TLRs) may influence the innate and adaptive immune responses and affect the susceptibility to *H. pylori* or the disease outcomes. But the details and association to different polymorphisms and different clinical expression in patients infected with *H. pylori* have remained unclear. The purpose of this study was to investigate the effect of TLR-4 Asp299Gly polymorphism on expression levels of IL-6 and IL-18 genes in patients infected with *H. Pylori* in comparison to uninfected patients.

Methods: In a case-control study, biopsies were collected from 58 *H. pylori*-infected and 44 uninfected subjects. Genotypes of TLR-4 Asp299Gly single-nucleotide polymorphism were assessed through polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The expression levels of mucosal IL-6 and IL-18 mRNA were measured by real time-PCR. Cytokine expression levels in the two groups were analysed using the t test.

Results: The frequencies of D/D and D/G genotypes were respectively 55.2% and 44.8% in *H. pylori*-infected and 77.2% and 22.8% in uninfected subjects. The expression level of IL-6 in *H. pylori* infected patients with TLR-4 gene polymorphism was significantly higher (P=0.001). However, no significant relationship between the expression level of IL-18 and TLR-4 gene polymorphism was reported in patients infected with *H. pylori* (P=0.419). In addition, no significant relationship between IL-6, IL-18 expression levels and TLR-4 gene polymorphism was reported in uninfected patients.

Conclusion: TLR-4 Asp299Gly Gene single-nucleotide polymorphism increases the expression levels of IL-6 and has an important role in development of *H. pylori*-associated gastritis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Polymorphism, IL-6, IL-18, TLR-4, Gastritis