

بیان ژن VEGF و MMp9 در اثر تیمار با پروتئین نوتروکیپ فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکترپیلوری بر مدل سرطان پستان

ندا سلیمانی (PhD)^۱، بهارک فرهنگی (MSc)^۲، اشرف محبتی مبارز (PhD)^{۳*}، فاطمه اطبایی (PhD)^۴
زهیر حسن صراف^۵

- گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس
- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۹۳/۷/۲ اصلاح: ۹۳/۹/۵، پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان پستان از علل عمدۀ مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. درمان‌های دارویی سیتو توکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار می‌باشد. پروتئین نوتروکیپ فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکترپیلوری (HP-NapA)، یکی از مهمترین پروتئین‌های ترشحی هلیکوباکترپیلوری است. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن VEGF و MMp9 در اثر تیمار با پروتئین نوتروکیپ فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکترپیلوری بر مدل متاستازیک سرطان سینه است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، از ۱۸ سرموش ماده نژاد Balb/c ۶-۸ گرم استفاده شد. موش‌های توموری تهیی و در ۳ گروه تست و کنترل (درمان با پروتئین نوتروکیپ، کنترل مثبت که داروی خدسرطانی ترانستوزمپ دریافت کردند و گروه کنترل منفی (PBS) تقسیم شدند. بیان و تخلیص پروتئین نوتروکیپ HP-NapA با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با زین نیکل (Qiagen) انجام شد. موش‌های توموری سرطان سینه با A تیمار شدند. بیان ژن‌های 9-VEGF و MMP9 با روش real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان پروتئین با روش SDS-PAGE تایید شد. اندازه پروتئین بیان شده ۲۰۰۰۰ دالتون بود. نتایج نشان داد که پروتئین HP-NapA موجب کاهش بیان ژنهای VEGF و MMP9 در مقایسه با گروه کنترل منفی می‌گردد. این کاهش میزان بیان، حدود یک چهارم بیان ژن‌های گروه کنترل بود ($<0.1\%$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که HP-NapA اثر کاهشی بر بیان ژن‌های دخیل در متاستاز بر مدل موش‌های توموری سرطان سینه در مطالعات حیوانی دارد. این پروتئین ممکن است به عنوان یک ابزار جدید برای راهکارهای درمانی در آینده برای درمان سرطان مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور فعال کننده نوتروفیلی، سرطان پستان، متاستاز، اینمنی درمانی.

مقدمه

تولید ایترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود که موجب آغاز بروز واکنش ایمنی موثر علیه عفونت یا سرطان بطور غالب می‌باشد (۱). سرطان پستان، شایعترین بدیخیمی در زنان ایرانی است که ۱۸/۹ درصد از آمار سرطان در این جنس را تشکیل می‌دهد. علی‌رغم پیشرفت‌های چشمگیر در تشخیص و درمان سرطان پستان، مرگ و میر در نتیجه متاستاز سرطان پستان در زنان مبتلا با وجود انجام جراحی و درمان‌های لازم، به عنوان معضل پزشکی همچنان باقی مانده است (۲). پیشرفت سرطان به طور بسیار شدیدی بقاء بیمار را به خطر می‌اندازد و استراتژی‌های درمانی را با شکست مواجه می‌کند. برای متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت مجاور، ابتدا باید این سلولها به داخل بافت پایه (Basement membrane) نفوذ کنند و سد ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix) را از بین ببرند. در این مرحله آنزیم‌های پروتئاز از

فاکتور فعال کننده نوتروفیلی (HP-NAP) یکی از پروتئین‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری است. حین رشد باکتری، مولکول‌های HP-NAP از باکتری رها شده و مقداری از آن در سطح غشاء خارجی باکتری به شکل متصل باقی می‌ماند. HP-NAP متصل به سلول می‌تواند واسطه اتصال باکتری با کربوهیدراتهای سطح سلول میزان باشد (۳). این پروتئین ۱۵۰ کیلوالوتونی که توسط ژن nap کد می‌شود، در تمامی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد اما میزان بیان آن در سویه‌های مختلف متفاوت است. این پروتئن به طور وسیعی در میان ایزوژله‌ها حفاظت شده است. HP-NAP به عنوان آگونیست TLR2، IL12 از دارای خاصیت ایمونومدولاتوری بوده و توانایی القای بیان IL23 از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های انسانی را دارد. این پروتئین با داشتن پتانسل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از Th1 به Th2 به واسطه

□ این مقاله حاصل پایان نامه ندا سلیمانی دانشجوی دکتری رشته باکتری شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر اشرف محبتی مبارز

آدرس: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس. تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۸۶۲

(IBW) سوسپانسیون شده و توسط سونیکاتور در ۱۰ سیکل ۴۰ ثانیه ای با سرعت ۹۰ درصد تحت شرایط ۴ درجه سانتی گراد شستشو داده شدند. سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ (۰°C, ۴^۰ rpm, ۲۰ min, ۱۲۰۰۰ rpm) شده و سوپرناتانت حاصل جمع آوری و از فیلتر ۱۱/۰/۴۵ عبور داده شد. پس از عبور سوپرناتانت پروتئینی، شستشوی ستون با بافر شستشوی تا زمانی که جذب نوری ۲۸۰ نانومتر خروجی ستون به صفر برسد، ادامه یافت. سپس بافر شستشوی دوم به ستون اضافه شد و تمام خروجی در یک ظرف مجزا نگهداری شد. در نهایت بافر شستشوی سوم اضافه شد و خروجی ستون نیز به طور جداگانه جمع آوری شد. پس از جمع آوری جزء پروتئینی جدا شده از ستون، آنالیز الکتروفورز-SDS-PAGE به منظور بررسی خلوص آن ها انجام شد. به منظور حذف ایمیدازول از محلول پروتئینی از روش دیالیز تجویض بافر در حضور بافر PBS استفاده شد (۹). ارزیابی پروتئین نوترکیب به روش SDS-PAGE به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب از روش الکتروفورز SDS-PAGE با غلاظت ۱۲/۵٪ ژل پلی اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده Pre-stain ladder SM0607 (شرکت فرماتاز) و لدر ۲۰۰ کیلو Dalton استفاده شد. در نهایت ژل پلی اکریل آمید با رنگ کوماسی G-250 رنگ آمیزی شده و باند مورد نظر در حضور مارکر پروتئینی که نشان دهنده پروتئین نوترکیب بود، بررسی شد (۸).

کشت سلولی: رده سلولی متاستاتیک سرطان پستان (4T1) از بانک سلولی انتیتیوپاستور ایران خریداری شد. سلولها در محیط کشت DMEM ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین استریتومایسین و ۵ درصد CO₂ رشد داده شدند. سلولها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین (Trypsin 0.25) درصد (acid EDTA-0.02 شرکت Gibco آمریکا خریداری شد (۱۰).

مدل موش حیوانی و شرایط نگهداری موش توموری: ۱۸ سر موش ماده ۶-۸ هفته ای با وزن ۱۹-۲۳ گرم (انتیتیوپاستور، ایران) تهیه و در ۳ گروه ۶ تایی دسته بندی شدند.

القاء سرطان پستان: محل تزریق با پنبه و الکل ضد عفونی شد. در روز صفر، تزریق سلول سرطانی 4T1 به صورت زیر جلدی به تمام موشها انجام گرفت. محل تزریق مجاور پایین ترین غده پستانی سمت چپ در نظر گرفته شد. از روز پانزدهم تزریق (نمایان شدن تومور) به موش های گروه درمان به مدت دو هفته با فواصل زمانی مشخص از پروتئین نوترکیب با غلاظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به صورت داخل ساقی تزریق شد برای گروه کنترل مثبت از داروی ضد سرطانی ترانستوزومپ با شرایط مشابه استفاده گردید و به موش های گروه کنترل منفی PBS تزریق شد.

بررسی تغییرات بیان ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR

استخراج RNA: ابتدا بافت توموری در هاون استریل در حضور ازت مایع کاملاً خورد و له گردید و به میکروتیوب های عاری از RNase انتقال داده شد. یک میلی لیتر محلول تراپیزول به ازای هر میکروتیوب حاوی بافت له شده توموری افزوده شد و به آرامی چندین بار پیپتائز شد تا قطعات بافتها در تراپیزول حل شوند. به محلول یکنواخت حاوی سلولها و تراپیزول، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم (به ازای

جمله متالوپروتئینازها (MMPs) با هضم ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات آن باعث تسهیل تهاجم سلول های سرطانی به بافت های دیگر می شود و دارای نقش بسیار مهمی در تومورزایی، گسترش سرطان و متاستاز هستند (۴). تاکنون به خوبی روشن شده است که سلول های توموری نسبت به سلول های سالم میزان پروتئاز بیشتری تولید می کنند و ارتباط مثبت بین میزان تهاجم سلول ها و سطح پروتئاز آن ها هم در مدل های تومور آزمایشگاهی و هم در تومورهای بالینی انسانی ثابت شده است (۴ و ۳). بنابراین گمان می رود که آنزیمهای مذکور نقش بسزایی در گسترش تumor تأثیر فاکتورهای رشد و سیتوکینها قرار دارد و در نتیجه نسبت به بافت نرمال بیان متفاوتی دارند (۵). رگزائی به رشد رگهای خونی در اطراف و داخل غده توموری گفته شده و باعث تخلیه مواد زائد از تومور و رساندن اکسیژن و مواد غذایی جدید به آنچا می شود. این پدیده در اثر ترشح فاکتورهای رگساز مثل VEGF از سلولهای سرطانی بر روی سلولهای نرمال اطراف فعال می شود. سرتانهایی که قادر به بیان VEGF هستند، توانایی رشد و متاستاز می یابند (۶ و ۷). چنانچه ترکیبی قادر به کاهش تولید پروتئینهای دخیل متاستاز و مهار رگزائی سلول های سرطانی باشد، می تواند بعنوان راهگشایی برای جلوگیری از پیشرفت این بیماری صعب العلاج مطرح باشد. از آنجایی که ژن های متاستازی و رگزائی نقش مهمی را در تهاجم سلولهای سرطانی به مناطق مختلف بین ایفا می کنند، لذا در این مطالعه، بیان ژن های VEGF و MMP9 در اثر تیمار با پروتئین نوترکیب HP-Nap ہلیکوباکترپیلوری بر مدل متاستاتیک سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری و محیط کشت: در این مطالعه تجربی ابتدا از سویه اشريشيا کلی BL21 به عنوان میزان بیانی جهت بیان ژن napA کلون شده در وکتور بیانی pet28a استفاده شد. از محیط لوریا برتانی (LB) حاوی کانامیسین (۵) به میزان ۱ μg/ml چهت تکثیر سویه های حامل پلاسمید pET-28a استفاده گردید.

القا و بیان پروتئین نوترکیب NapA: از توالی ژن napA از genescrypt آمریکا استفاده شد. ژن کلون شده در حامل بیانی (وکتور) pet 28a انتقال داده شد. به منظور بیان پروتئین نوترکیب NapA از میزان BL21 E. coli استفاده شد. جهت انجام القاء از کشت شبانه باکتری در حضور ۵۰ μg/ml کانامیسین استفاده شد. القاء در حجم بالا و پس از رسیدن جذب نوری محیط به حدود ۰/۸-۱ (در طول موج ۵۵۰ نانومتر) انجام شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از محلول IPTG Isopropyl-beta-thio galactopyranoside (galactopyranoside) با غلاظت نهایی ۱/۵ میلی مولار در هر میلی لیتر و انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۸).

تخلیص و بیان پروتئین نوترکیب NapA: از آن جایی که در وکتور مورد استفاده His-tag تبیه شده بود و با توجه به پرایم طراحی شده می توان از رزین نیکل و کروماتوگرافی تمایلی جهت خالص سازی پروتئین استفاده کرد. به منظور تهیه لیز سلولی، رسوپ E. coli کشت داده شده در ۱۰۰ میلی لیتر بافر تخریب

طراحی پرایمرها: به منظور تکثیر هر قطعه زنی، یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن انتخاب شد که شامل پرایمر رفت (Forward) و برگشت (Reverse) است.

طراحی پرایمرها توسط نرم افزارهای Oligo ID, Perl ID و Primer صورت گرفت (جدول ۲).

واکنش Real-time PCR: Real-time PCR به معنای جمع کردن مداوم سیگنال فلورسنس از واکنش زنجیره ای پلیمراز در طول سیکلها می‌باشد و Quantitative real-time PCR به تبدیل این سیگنالهای فلورسنس به مقادیر عددی برای هر نمونه احلاق می‌گردد. از روش مبتنی بر استفاده از رنگ فلورسنس SYBR GreenI در تحقیق حاضر استفاده شد. انجام واکنش Quantitative real-time PCR در دستگاه Applied Biosystems 7500 real-time PCR SYBR® Premix (Perfect Real time) کرفت. در تحقیق حاضر از Applied Biosystems Ex TaqTMII (شرکت تاکارا) جهت بررسی بیان ژنها استفاده گردید (جدول ۳).

جدول ۲. توالی و طول قطعه حاصل از پرایمرهای مرحله Real Time-PCR

طول محصول PCR	ترافد آف به ۳'	نام ژن
۱۷۶	F 5'TTCCAGTACCAAGACAAAGCC3' R 5'CACGGTTGAAGCAAAGAAGG3'	MMP9
۱۹۷	F 5'AGGCTGCTGTAACGATGAAG3' R 5'GTGCTGGCTTGGTGAGG3'	VEGFA
۱۳۹	F 5'CCCACTCCTCACCTTGAC3' R 5'CATAACCAGGAAATGAGCTTGACAA3'	GAPDH

جدول ۳. برنامه Real-time PCR

مراحل PCR	تمدد سیکل	مدت زمان	درجه حرارت	ترافد آف به ۳'
Pre denaturation	۱	۱۵ دقیقه	۹۵	
Denaturation		۵ ثانیه	۹۵	
Annealing	۴۰۳	۶۳		
Extention		۳۴ ثانیه	۷۲	

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه T-ANOVA One-way Analysis of Variance) (آزمون T و با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد و p < 0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

القاء و بیان پروتئین NapA در E.coli BL21: جهت ارزیابی پروتئین ساخته شده پس از القاء، ابتدا سلولهای E.coli لیز شده و سپس پروتئین محلول آن ها بررسی شد. پروتئین محلول سلول بر روی ڈی اکریل آمید و در حضور دترزنت

یک میلی لیتر تریزول) افزوده و میکروتیوب به مدت ۱۵ ثانیه ورتكس گردید. میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه میکروتیوب در دمای ۴°C با دور ۱۲۰۰ g سانتریفوژ شد.

پس از سانتریفوژ ۳ فاز تشکیل شد. فاز روئی حاوی RNA و در زیر، DNA، پروتئین و اجزای سلول و تریزول قرار داشت. فاز روئی به آرامی جدا و به میکروتیوبهای فاقد RNase منتقل شد. به محلول به دست آمده از مرحله قبل به مقدار هم حجم ایزوپروپانول افزوده شد. مخلوط فوق ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰-۲۰°C درجه سانتیگراد قرار داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه میکروتیوب در دمای ۱۲۰۰ g سانتریفوژ شد. مایع روئی جدا و به رسوب داخل تیوب، یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ افزوده شد. مایع روئی خارج و میکروتیوب در دمای محیط قرار داده شد تا اثانول موجود در رسوب تبخیر شود. سپس غلظت و خلوص RNA توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد.

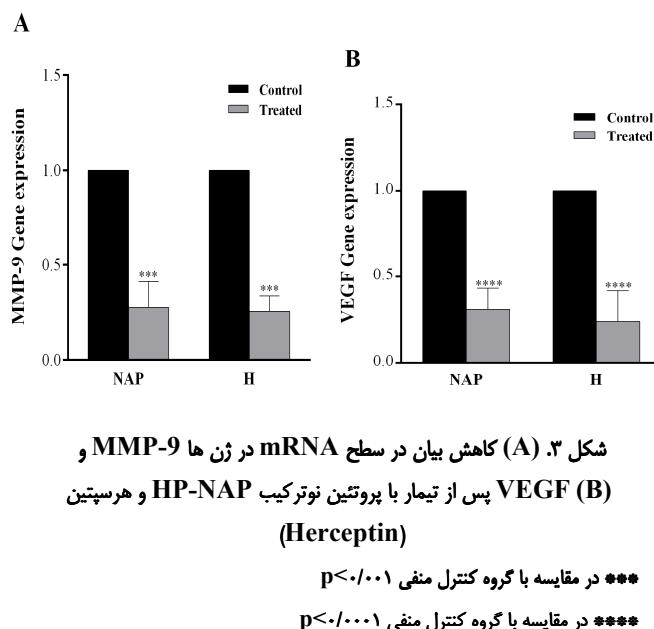
بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده: پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روشهای UV اسپکتروفوتومتری با استفاده از جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفوروز ژل آکارز جهت حضور باندهای ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S بررسی گردید. بررسی غلظت RNA با روش اسپکتروفوتومتری یک روش کمی بوده و می‌توان غلظت و خلوص نمونه RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بدست آورد. محاسبه OD₂₆₀/OD₂₈₀ بیانگر میزان خلوص RNA استخراج شده می‌باشد. چنانچه این نسبت کمتر از ۱/۸ بدست آید، احتمال وجود آلدگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک نظیر فل وجود دارد. به منظور بررسی کیفیت RNA، مقدار ۱ میکروگرم از نمونه توسط الکتروفوروز افقی روی ژل آکارز ۱٪ مورد بررسی قرار می‌گیرد. باندهای ۱۸S و ۲۸S مرتبط با RNA ریبوزومی قرار گرفته در موقعیت های ۸۰۰ و ۱۵۰۰ جفت بازی از مارکر DNA، به عنوان شاخص کیفیت استخراج شده مد نظر قرار می‌گیرند.

سترنز cDNA از RNA های استخراج شده: سترنز cDNA که بوسیله آنزیم (Takara Bio) نسخه بردار مغکوس انجام شد. برای سترنز cDNA از کیت PrimeScript™ RT reagent استفاده شد. کلیه مراحل با وسائل و cDNA محلولهای عاری از RNase انجام شد. همچنین به منظور ساخت RNA هایی با غلظت یکسان، در مورد هر نمونه با توجه به غلظت RNA حجمی را برداشته که در آن به میزان ۱۰۰۰ نانوگرم RNA موجود بود و با آب و Master Mix حجم نهایی به ۱۰ μl رسید (جدول ۱).

جدول ۱. تهیه یک واکنش سترنز Master Mix برای یک واکنش سترنز

مواد	غلظت نهایی	مقدار
5X PrimeScript™ Buffer	2 μl	1X
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 μl	-
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
total RNA	500 ng	-
RNase Free dH2O	Variable	-
Total	10 μl	-

در مقایسه با گروه کنترل منفی به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($p < 0.001$). بيان ژن $MMP-9$ در موش‌های گروه کنترل مثبت نیز دارای کاهش معنی‌داری بود ($p < 0.001$). در بيان ژن mRNA VEGF و HP-NAP دو گروه درمان با پروتئین نوترکیب HP-NAP و کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.001$). شکل ۳.



شکل ۳ (A) کاهش بيان در سطح mRNA در ژن ها **MMP-9** و **VEGF** (B) پس از تیمار با پروتئین نوترکیب **HP-NAP** و هرپتین (Herceptin)

*** در مقایسه با گروه کنترل منفی $p < 0.001$

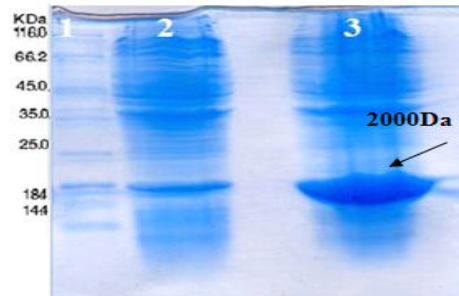
**** در مقایسه با گروه کنترل منفی $p < 0.001$

بحث و نتیجه گیری

دارای خاصیت ایمونومدولاتوری بوده و توانایی القای بيان سیتوکین های فعال کننده از مونوцитها و نوتروفیلهای انسانی را دارد (۱۱). این پروتئین با داشتن پتانسل تغییر پاسخهای سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از فنوتیپ Th1 به Th2 به واسطه تولید ایترافرون گاما و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود. در حقیقت HP-NAP به عنوان ابزاری جدید جهت دادن سیستم ایمنی بخصوص سلولهای دندریتیک به سمت پاسخ Th1 شناخته شده است و سلولهای مذکور را به خوبی تحریک می‌کند. Haghghi و همکاران از روش بیوانفورماتیک برای بهینه سازی کلون ژن مورد نظر در اشیشیاکلی استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد کلون شده با پرایمرهای مهندسی شده و در نهایت پروتئین تولید شده حدود ۲۰ کیلوالوتون بود (۱۲). VEGF=Vascular endothelial growth factor (growth factor) عاملی مهم در رگزابی تومور است (۱۳). در مطالعه حاضر بيان ژن های **MMP-9** و **VEGF** در گروه درمان با پروتئین نوترکیب HP-NAP در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش سطح بيان معنی داری نشان داده، همچنین این پروتئین نوترکیب دارای اثر مشابه ای با داروی شیمیابی ضد سرطانی ترانستزوژومپ (هرپتین) در مهار بيان ژن های **MMP-9** و **VEGF** می‌باشد. سلولهای تومور در مقایسه با سلولهای عادی بدن در معرض تنش اکسیداتیو بالاتری هستند. مطالعات انجام شده نشان داده است که نحوه بيان VEGF به مقدار بالایی به میزان پتانسیل اکسایش-کاهش (ORP) بین سلولی وابسته است (۱۴). Mousavi و همکاران اثرات عصاره زعفران را بر بيان ژن VEGF-A در شرایط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی مورد مطالعه قرار

G-250 از یکدیگر تفکیک شده و پس از رنگ آمیزی با کوماسی SDS کلولیدی، مورد بررسی قرار گرفت. از آن جایی که پروتئین NapA تولید شده بود، پروتئین با وزن مولکولی ۲۰ کیلوالوتون به دست آمد (شکل ۱).

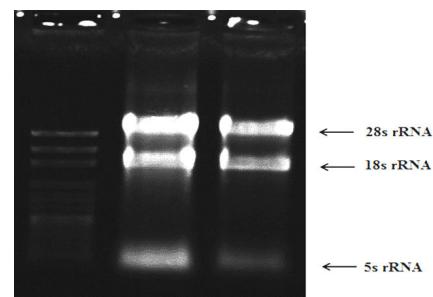
بيان و تخلیص پروتئین نوترکیب HP-NAP: بيان پروتئین نوترکیب مورد نظر در تحقیق توسط SDS-PAGE تأیید شد. نتایج بدست آمده از آنالیز SDS-PAGE، بيان یک پروتئین در محدوده باند ۲۰ کیلوالوتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۱). بيان این پروتئین از ساعت سوم آغاز شده و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود رسید بین ساعت پنجم، هفتم و القا شبانه تفاوت قابل ملاحظه ای وجود نداشت. با بررسی های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب به صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوزن) در فاز رسوبی قرار دارند. رسوبی بودن این پروتئین با نتایج بدست آمده از تخلیص فاز مایع حاصل از لیزات سلول با روش Native و استفاده از بافرهای فاقد اوره نیز تایید گردید و مشخص شد تنها مقدادر اندازی از پروتئین نوترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این الکتروفورتیک نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب حاکی از همراه پروتئین می‌باشد (شکل ۱)، براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفوتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیتر کشت باکتری حدودا ۴۰۰ میلی‌گرم تعیین شد. سلامت RNA های استخراج شده با روش الکتروفورز نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز بررسی گردید (شکل ۲).



شکل ۱. ارزیابی بيان پروتئین NapA در ژل (۱۲%) : چاهک

۱: مارکر با وزن پابن، چاهک ۲: NapA ناشده، چاهک ۳: NapA شده با

IPTG ۰/۱ mM



شکل ۲. الکتروفورز نمونه های RNA استخراج شده روی آگارز ۱٪

بررسی بيان ژنهای **MMP-9 و **VEGF** با استفاده از روش Real-Time PCR:** نتایج حاصل از واکنش پلیمراز کمی در زمان واقعی نشان داد که میزان **HP-NAP** در موش‌های گروه درمان با پروتئین نوترکیب **MMP-9** در

برای اولین بار در دنیا صورت گرفته است. نتایج این مطالعه گویای این مطلب است که پروتئین نوتრکیپ فعال کننده نوتروفیلی از هلیکوباکتر پیلوئی می‌تواند به عنوان یک فاکتور موثر موجب جلوگیری از متاستاز و رگرائی سلول‌های سرطانی در مدل متاستاتیک سلول‌های سرطانی سینه در موش گردد. با توجه به نتایج این پژوهش، این پروتئین به دلیل دارا بودن پتانسیل کاهش بیان ژن MMP-9 و ژن VEGF که بیومارکر ویژه آنزیوژن می‌باشد، می‌تواند به همراه یک داروی ضد سرطان در حذف سلول‌های سرطانی موثر واقع شود. با توجه به خواص موجود، این پروتئین نوتრکیپ می‌تواند ابزار مناسب و موثری جهت کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان سرطان در آینده باشد. این مطالعه گشايشی برای ایده مذکور چهت درمان سرطان با استفاده از خاصیت ضد رگرائی و ایننومولال‌توری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از راهنمایی‌های آقای دکتر مجید صادقی زاده در انجام تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

دادند. نتایج بررسی‌های آنان کاهش معنی دار در میزان بیان ژن VEGF-A تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زغفران نسبت به سلول‌های گروه کنترل را نشان داد به نحوی که بیشترین، تغییرات کاهشی بیان ژن مریوط به بیشترین غلظت عصاره زغفران بود (۱۵). De GPER/αHIF-1 Ferancesco و همکاران با مطالعه مسیر سیگنالینگ VEGF مورد بررسی رگرائی و هیبیوسکی وابسته به انزیوژن را در ارتباط با ژن VEGF قرار دادند (۱۶). Tsuboi و همکاران یک جز از گیاه زنجیبل را بر روی بیان ژن VEGF مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنان حاکی از آن بود که این بخش از گیاه، سبب کاهش بیان ژن VEGF در سلول‌های سرطانی معدہ AGS می‌شود (۱۷).

Boonrao و همکاران مشتقات کورکومین را بر سلول‌های سرطانی سینه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بررسی‌های آنها بر بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۳ نشان داد که این مشتق سبب کاهش بیان ژن مذکور شده و بر کاهش میزان مهاجرت سلولی موثر است (۱۰). با توجه به مطالعات موجود تاکنون هیچ پژوهشی در مورد اثرات پروتئین نوتრکیپ HP-NAP بر بیان ژن‌های VEGF و MMP-9 در مدل حیوانی چهت درمان سرطان صورت نگرفته و این پژوهش

VEGF and MMP-9 Gene Expression Caused by Treatment with Helicobacter Pylori Neutrophil-activating Recombinant Protein in a Breast Cancer Model

N. Soleimani (PhD)¹, B. Farhangi (MSc)², A. Mohabati Mobarez (PhD)*¹, F. Etyabi (PhD)³,
Z. Hassan Saraf (PhD)⁴

1. Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.
2. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.
3. Nanotechnology Research Centre, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
4. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(3); Mar 2015; PP: 13-19

Received: Sep 24th 2014, Revised: Nov 26th 2014, Accepted: Feb 4th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Breast cancer is a major cause of death in women, worldwide. Cytotoxic drugs may lead to various adverse side-effects in patients. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein (HP-NAP) is one of the most important proteins, produced by helicobacter pylori. The purpose of this study was to investigate the expression of VEGF and MMP-9 genes, caused by HP-NAP treatment in a breast cancer model.

METHODS: In this experimental study, 18 female BALB/c mice, aged 6-8 weeks (19-23 g), were used. The mice were allocated to three groups: test group (treated with recombinant HP-NAP), positive control group (treated with an anti-cancer drug called trastuzumab), and negative control group (receiving phosphate-buffered saline). Expression and purification of HP-NAP were performed using nickel-resin affinity chromatography (Qiagen). The mice with breast tumors were treated with HP-NAP. MMP-9 and VEGF gene expression was measured using real-time polymerase chain reaction (PCR).

FINDINGS: Protein expression was confirmed, using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The analysis showed the expression of a 20,000 dalton protein. Moreover, MMP-9 and VEGF gene expression decreased more significantly in the test group (due to treatment with HP-NAP), compared to the negative control group. The reduced expression in the test group was almost a quarter of the expression in the control group ($p<0.01$).

CONCLUSION: The results showed that HP-NAP can reduce the expression of genes involved in metastasis in a mouse model of breast cancer. Therefore, this protein can be exploited for future therapeutic strategies in cancer treatment.

KEY WORDS: *Neutrophil-Activating Factor, Breast Cancer, Metastasis, Immunotherapy.*

Please cite this article as follows:

Soleimani N, Farhangi B, Mohabati Mobarez A, Etyabi F, Hassan Saraf Z. VEGF and MMP-9 Gene Expression Caused by Treatment with Helicobacter Pylori Neutrophil-activating Recombinant Protein in a Breast Cancer Model. J Babol Univ Med Sci. 2015; 17(3):13-19.

*Corresponding Author: A. Mohabati Mobarez (PhD)

Address:Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.

Phone:+98 31 5562 1157

Email:mmmobarez@modares.ac.ir

References

1. Carlsohn E, Nystrom J, Bolin I, Nilsson CL, Svennerholm AM. HpaA is essential for Helicobacter pylori colonization in mice. *Infect Immun* 2006;74(2):920-6.
2. Nystrom J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*. 2007;25(14):2591-8.
3. Uría JA, Ståhlé-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C. Regulation of collagenase expression in human breast carcinoma is mediated by stromal epithelial cell interactions. *Cancer Research*. 1997;57(21):4882-8.
4. Martinella-Catusse C, Polette M, Noel A, Gilles C, Dehan P, Munaut C, et al. Down-regulation of MT1-MMP expression by the alpha 3 chain of type IV collagen inhibits bronchial tumor cell line invasion. *Lab Invest*. 2001;81(2):167-75.
5. Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem*. 2002;48(8):1198-205.
6. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor REB. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. *New Frontiers in Angiogenesis*. 2006;5:97-109.
7. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, et al. VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol*. 2001;193(3):325-32.
8. Iankov ID, Penheiter AR, Carlson SK, Galanis E. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Immunol Methods*. 2012;384(1-2):1-9.
9. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine*. 2010;28(42):6923-9.
10. Boonrao M, Yodkeeree S, Ampasavate C, Anuchapreeda S, Limtrakul P. The inhibitory effect of turmeric curcuminoids on matrix metalloproteinase-3 secretion in human invasive breast carcinoma cells. *Arch Pharm Res*. 2010;33(7):989-98.
11. D'Agostino D, Racioppi M, Filianoti A, Di Gianfrancesco L, Codolo G, Fassan M, et al. Therapy for non-muscle invasive bladder cancer: HP-NAP. *Urologia*. 2012;79(2):142-8.
12. Haghghi MA, Mohabati Mobarez A, Salmanian AH, Zali MR, Moazzeni SM, Karkhane AA. Application of bioinformatics and genetic engineering for designing optimized cloning and overexpression of neutrophil activating protein of *helicobacter pylori* in *escherichia coli*. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2013;21(85):40-54 [In Persian].
13. Cuzick J, Sestak I, Pinder SE, Ellis IO, Forsyth S, Bundred NJ, et al. Effect of tamoxifen and radiotherapy in women with locally excised ductal carcinoma in situ: long-term results from the UK/ANZ DCIS trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(1):21-9.
14. Delozier T, Spielmann M, Mace-Lesec'h J, Janvier M, Hill C, Asselain B, et al. Tamoxifen adjuvant treatment duration in early breast cancer: initial results of a randomized study comparing short-term treatment with long-term treatment. *Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Breast Group*. *J Clin Oncol*. 2000;18(20):3507-12.
15. Mousavi M, Baharara J, Shahrokhabadi Kh, Zafar Balanejad S. Effect of saffron extract on VEGF-A expression in MCF7 cell line. *J Kermanshah Univ Med Sci*. 2014;17(12):749-58. [In Persian]
16. De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, Maggiolini M. HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):R64.
17. Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, et al. Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncol Rep*. 2014;31(1):57-64.