

بیان ژن VEGF و MMP9 در اثر تیمار با پروتئین نو ترکیب فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکتریلوری بر مدل سرطان پستان

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

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

دریافت: ۹۳/۲/۲۲، اصلاح: ۹۳/۹/۵، پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان پستان از علل عمده مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. درمان‌های دارویی سیتوتوکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار می باشد. پروتئین نو ترکیب فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکتریلوری (HP-NapA)، یکی از مهمترین پروتئینهای ترشحی هلیکوباکتریلوری است. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن VEGF و MMP9 در اثر تیمار با پروتئین نو ترکیب فعال کننده نوتروفیلی هلیکوباکتریلوری بر مدل متاستاتیک سرطان سینه است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، از ۱۸ سر موش ماده نژاد Balb/c ۶-۸ هفته‌ای با وزن ۱۹-۲۳ گرم استفاده شد. موش‌های توموری تهیه و در ۳ گروه تست و کنترل (درمان با پروتئین نو ترکیب، کنترل مثبت که داروی ضدسرطانی ترانستوزمپ دریافت کردند و گروه کنترل منفی PBS) تقسیم شدند. بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب HP-NapA با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با رزین نیکل (Qiagen) انجام شد. موش‌های توموری سرطان سینه با HP-NapA تیمار شدند. بیان ژن‌های MMP-9 و VEGF 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 MMP-9 و VEGF در مقایسه با گروه کنترل منفی می گردد. این کاهش میزان بیان، حدود یک چهارم بیان ژن‌های گروه کنترل بود ($p < 0.01$).

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.

واژه های کلیدی: فاکتور فعال کننده نوتروفیلی، سرطان پستان، متاستاز، ایمنی درمانی.

مقدمه

تولید اینترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود که موجب آغاز بروز واکنش ایمنی موثر علیه عفونت یا سرطان بطور غالب می‌باشد (۲). سرطان پستان، شایعترین بدخیمی در زنان ایرانی است که ۱۸/۹ درصد از آمار سرطان در این جنس را تشکیل می دهد. علی رغم 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 (۳). پیشرفت سرطان به طور بسیار شدیدی بقاء بیمار را به خطر می‌اندازد و استراتژی‌های درمانی را با شکست مواجه می کند. 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 غشای خارجی باکتری به شکل متصل باقی می‌ماند. HP-NAP متصل به سلول می‌تواند واسطه اتصال باکتری با کربوهیدراتهای سطح سلول میزبان باشد (۱). این پروتئین ۱۵۰ کیلودالتونی که توسط ژن *nap* کد می‌شود، در تمامی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد اما میزان بیان آن در سویه‌های مختلف متفاوت است. این پروتئین به طور وسیعی در میان ایزوله‌ها حفاظت شده است. HP-NAP به عنوان آگونیست TLR2، دارای خاصیت ایمونومودلاتوری بوده و توانایی القای بیان IL12 و IL23 از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های انسانی را دارد. این پروتئین با داشتن پتانسیل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از Th2 به فنوتیپ Th1 به واسطه

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

* مسئول مقاله: دکتر اشرف محبتی مبارز

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

E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir

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 (۳ و ۴). بنابراین گمان می رود که آنزیمهای مذکور نقش بسزایی در گسترش تومور داشته باشند. مطالعات نشان داده که در سلول های توموری بیان ژنهای MMP تحت 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 غذائی جدید به آنجا می شود. این پدیده در اثر ترشح فاکتورهای رگساز مثل VEGF از سلولهای سرطانی بر روی سلولهای نرمال اطراف فعال می شود. سرطانهایی 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 بدن ایفا می کنند، لذا در این مطالعه، بیان ژن های VEGF و MMP9 در اثر تیمار با پروتئین نوترکیب HP-Nap هلیکوباکتریلوری بر مدل متاستاتیک سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری و محیط کشت: در این مطالعه تجربی ابتدا از سویه اشریشیا کلی BL21 به عنوان میزبان بیانی جهت بیان ژن *napA* کلون شده در وکتور بیانی pet28a استفاده شد. از محیط لوریا برتانی (LB) حاوی کانامیسین (۵۰mg/ml) به میزان ۱ μg/ml جهت تکثیر سویه های حامل پلاسمید pet-28a استفاده گردید.

القا و بیان پروتئین نوترکیب NapA: از توالی ژن *napA* ساخته شده توسط شرکت genescript آمریکا استفاده شد. ژن کلون شده در حامل بیانی (وکتور) pet 28a انتقال داده شد. به منظور بیان پروتئین نوترکیب NapA، از میزبان بیانی BL21 *E. coli* استفاده شد. جهت انجام القاء از کشت شبانه باکتری در حضور ۵۰ μg/ml کانامامیسین استفاده شد. القا 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) با غلظت 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 تعبیه شده بود و با توجه به پرایمر طراحی شده می توان از رزین نیکل و کروماتوگرافی تمایلی جهت خلص سازی پروتئین استفاده کرد. به منظور تهیه لیز سلولی، رسوب *E. coli* کشت داده شده در ۱۰۰ میلی لیتر بافر تخریب

(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 (۴ °C، ۱۲۰۰۰ rpm، ۲۰ min) شده و سوپرناتانت حاصل جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ μ عبور داده شد. پس از عبور سوپرناتانت، پروتئینی، شستشوی ستون با بافر شستشو 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 تعویض 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 غلظت ۱۲/۵٪ ژل پلی اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور مارکر پروتئینی از پیش رنگ شده Pre-stain ladder SM0607 (شرکت فرمنتار) و لدر ۲۰۰ کیلو دالتون 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 انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین استریتومایسین (Penicillin-Streptomycin) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO2 رشد داده شدند. سلول ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین (Trypsin 0.25) درصد (Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA-0.02) درصد پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد (۱۰).

مدل موش حیوانی و شرایط نگهداری موش توموری: ۱۸ سر موش ماده Balb/c ۶-۸ هفته ای با وزن ۱۹-۲۳ گرم (انستیتو پاستور، 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 غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد برای گروه کنترل مثبت از داروی ضد سرطانی ترانستوزومپا 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 خور و له گردید و به میکروتیوب های عاری از RNase انتقال داده شد. یک میلی لیتر محلول ترايزول به ازای هر میکروتیوب حاوی بافت له شده توموری افزوده شد و به آرامی چندین بار پیپتاژ شد تا قطعات بافتها در ترايزول حل شوند. به محلول یکنواخت حاوی سلول ها و ترايزول، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (به ازای

طراحی پرایمرها: به منظور تکثیر هر قطعه ژنی، یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن انتخاب شد که شامل پرایمر رفت (Forward) و برگشت (Reverse) بود. طراحی پرایمرها توسط نرم افزارهای Oligo، Allel ID و Perl Primer صورت گرفت (جدول ۲).

واکنش Real-time PCR: Real-time PCR به معنای جمع کردن مداوم سیگنال فلورسنس از واکنش زنجیره ای پلیمرز در طول سیکلها می باشد و Quantitative real-time PCR به تبدیل این سیگنالهای فلورسنس به مقادیر عددی برای هر نمونه اطلاق می گردد. از روش مبتنی بر استفاده از رنگ فلورسنس SYBR GreenI در تحقیق حاضر استفاده شد. انجام واکنش real-time PCR در دستگاه ۷۵۰۰ Applied Biosystems صورت گرفت. در تحقیق حاضر از SYBR® Premix (Perfect Real time) 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

نام ژن	ترادف (۵ به ۳')	طول محصول PCR
MMP9	F 5'TTCCAGTACCAAGACAAAGCC3' R 5'CACGGTTGAAGCAAGAAGG3'	۱۷۶
VEGFA	F 5'AGGCTGCTGTAACGATGAAG3' R 5'GTGCTGGCTTTGGTGAGG3'	۱۹۷
GAPDH	F5'CCCACTCCTCCACCTTTGAC3' R5'CATAACAGGAAATGAGCTTGACAA3'	۱۳۹

جدول ۳. برنامه Real-time PCR

مراحل PCR	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد سیکل
Pre denaturation	۹۵	۱۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵	۵ ثانیه	
Annealing	۶۳		۴۰۳
Extention	۷۲	۳۴ ثانیه	

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One-way Analysis of Variance)، آزمون T (Student t-Test) 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 ژل پلی اکریل آمید و در حضور دترژنت

یک میلی لیتر تریزول) افزوده و میکروتیوب به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گردید. میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه میکروتیوب در دمای 4°C با دور $g = 12000$ 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 رویی 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 -20°C درجه سانتیگراد قرار داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه میکروتیوب در دمای 4°C با دور $g = 12000$ سانتریفوژ شد. مایع روئی جدا و به رسوب داخل تیوب، یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ افزوده شد. مایع رویی خارج و میکروتیوب در دمای محیط قرار داده شد تا اتانول موجود در رسوب تبخیر شود. سپس غلظت و خلوص RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

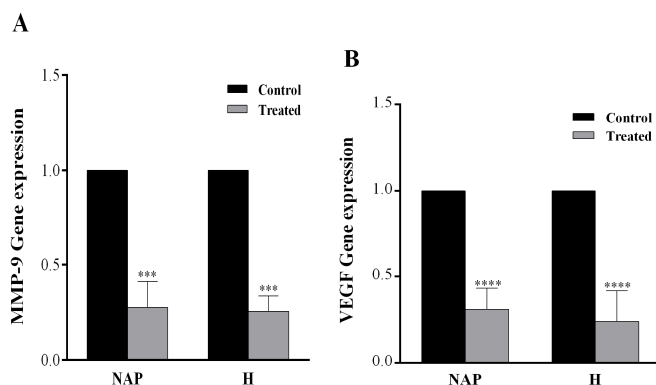
بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده: پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روشهای UV اسپکتروفتومتری با استفاده از جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز جهت حضور باند های RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S بررسی گردید. بررسی غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری یک روش کمی بوده و می توان غلظت و خلوص نمونه RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بدست آورد. محاسبه OD_{260}/OD_{280} بیانگر میزان خلوص RNA استخراج شده می باشد. چنانچه این نسبت کمتر از ۱/۸ بدست آید، احتمال وجود آلودگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک نظیر فنل وجود دارد. به منظور بررسی کیفی RNA، مقدار ۱ میکروگرم از نمونه توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار می گیرد. 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 RNA استخراج شده مد نظر قرار می گیرند.

سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده: سنتز cDNA که بوسیله آنزیم نسخه بردار معکوس انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت (Takara Bio) PrimeScript™ RT reagent استفاده شد. کلیه مراحل با وسایل و محلولهای عاری از RNase انجام شد. همچنین به منظور ساخت cDNA 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 $10\mu\text{l}$ رسید (جدول ۱).

جدول ۱. تهیه Master Mix برای یک واکنش سنتز cDNA

مواد	مقدار	غلظت نهایی
5X PrimeScript™ Buffer	$2\mu\text{l}$	۱X
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	$0.5\mu\text{l}$	-
Oligo dT Primer (50μM)	$0.5\mu\text{l}$	25 pmol
Random 6 mers (100μM)	$0.5\mu\text{l}$	50 pmol
total RNA	500 ng	-
RNase Free dH2O	Variable	-
Total	$10\mu\text{l}$	-

در مقایسه با گروه کنترل منفی به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($p < 0.001$). بیان ژن MMP-9 در موش‌های گروه کنترل مثبت نیز دارای کاهش معنی‌داری بود ($p < 0.001$). در بیان mRNA ژن VEGF نیز در هر 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 بیان در سطح mRNA در ژن‌ها MMP-9 و (B) VEGF پس از تیمار با پروتئین نوترکیب HP-NAP و هرپستین (Herceptin)

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

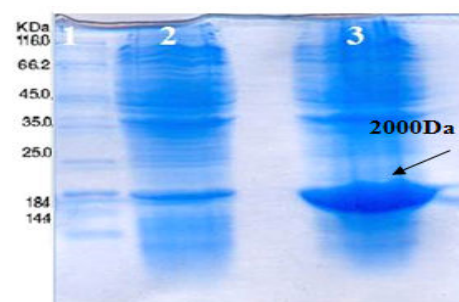
**** در مقایسه با گروه کنترل منفی $p < 0.0001$

بحث و نتیجه‌گیری

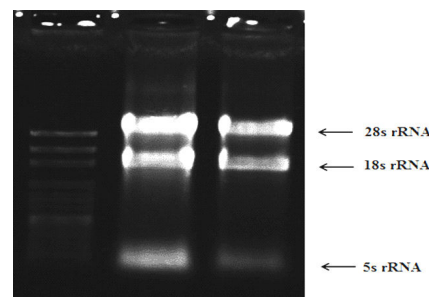
HP-NAP دارای خاصیت ایمنومودولاتوری بوده و توانایی القای بیان سیتوکین‌های فعال‌کننده از مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌های انسانی را دارد (۱۱). این پروتئین با داشتن پتانسل تغییر پاسخ‌های سیستم ایمنی، سبب تغییر فنوتیپ از Th2 به فنوتیپ Th1 به واسطه تولید اینترفرون گاما و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا می‌شود. در حقیقت HP-NAP به عنوان ابزاری جدید برای 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 بهینه‌سازی کلون ژن مورد نظر در اشریشیاکلی استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد ژن کلون شده با پرایمرهای مهندسی شده و در نهایت پروتئین تولید شده حدود ۲۰ کیلو دالتون بود (۱۲). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF=Vascular endothelial growth factor) عاملی مهم در رگ‌زایی تومور است (۱۳). در مطالعه حاضر بیان ژن‌های MMP-9 و VEGF در گروه درمان با پروتئین نوترکیب HP-NAP در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش سطح بیان معنی‌داری نشان دادند، همچنین این پروتئین نوترکیب دارای اثر مشابهی با داروی شیمیایی ضد سرطانی ترانستوزومپ (هرپستین) در مهار بیان ژن‌های 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 بیان VEGF به مقدار بالایی به میزان پتانسیل اکسایش-کاهش (ORP) بین سلولی وابسته است (۱۴). Mousavi و همکاران اثرات عصاره زعفران را بر بیان ژن VEGF-A در شرایط آزمایشگاهی بر روی رده سلولی مورد مطالعه قرار

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

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب HP-NAP: بیان پروتئین نوترکیب مورد نظر در تحقیق توسط SDS-PAGE تأیید شد. نتایج بدست آمده از آنالیز SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۲۰ کیلو دالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۲۰۴۷۷ دالتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۱). بیان این پروتئین از ساعت سوم آغاز شده و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود رسید بین ساعت پنجم، هفتم و اکتا شبانه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت. با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب به صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوژن) 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 تأیید گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتئین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفوریتیک نتایج تخلیص پروتئین نوترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این پروتئین می‌باشد (شکل ۱). براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیتر کشت باکتری حدوداً میزان ۴۰۰ میلی گرم تعیین شد. سلامت RNAهای استخراج شده با روش الکتروفورز نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز بررسی گردید (شکل ۲).



شکل ۱. ارزیابی بیان پروتئین NapA در ژل (۱۲٪) SDS-PAGE: چاهک ۱: مارکر با وزن پایین، چاهک ۲: NapA القا نشده، چاهک ۳: NapA القا شده با ۰/۸ mM IPTG



شکل ۲. الکتروفورز نمونه‌های RNA استخراج شده روی آگارز ۱٪

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

برای اولین بار در دنیا صورت گرفته است. نتایج این مطالعه گویای این مطلب است که پروتئین نوترکیب فعال کننده نوتروفیلی از هلیکوباکتر پیلوری می تواند به عنوان یک فاکتور موثر موجب جلوگیری از متاستاز و رگزائی سلول های سرطانی در مدل متاستاتیک سلول های 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 آنژیوزنز می باشد، می تواند به همراه یک داروی ضد سرطان در حذف سلول های سرطانی موثر واقع شود. با توجه به خواص موجود، این پروتئین نوترکیب می تواند ابزار مناسب و موثری جهت کاربردهای ایمنی درمانی برای درمان سرطان در آینده باشد. این مطالعه گشایشی برای ایده مذکور جهت درمان سرطان با استفاده از خاصیت ضد رگزایی و ایمنومودولاتوری می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از راهنمایی های آقای دکتر مجید صادقی زاده در انجام تحقیق تقدیر و تشکر می گردد.

دادند. نتایج بررسی های آنان کاهش معنی دار در میزان بیان ژن VEGF-A تیمار شده با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زعفران نسبت به سلولهای گروه کنترل را نشان داد به نحوی که بیشترین تغییرات کاهشی بیان ژن مربوط به بیشترین غلظت عصاره زعفران بود (۱۵). De Ferancesco و همکاران با مطالعه مسیر سیگنالینگ GPER/ α HIF-1 رگزایی و هیپوکسی وابسته به آنژیوزنز را در ارتباط با ژن VEGF مورد بررسی قرار دادند (۱۶). Tsuboi و همکاران یک جز از گیاه زنجبیل 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 سلول های سرطانی معده AGS می شود (۱۷).

Boonrao و همکاران مشتقات کورکومین را بر سلول های سرطانی سینه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بررسی های 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 نوترکیب HP-NAP بر بیان ژن های VEGF و MMP-9 در مدل حیوانی جهت 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. Uriá JA, Ståhle-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. Haghighi 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 Zanzan 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, Shahrokhbabadi 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.