

یاسمن حاجی نبی^۱، فلورا فروزش^۲، محمدجواد احسانی اردکانی^۳، محمد رستمی نژاد^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲ استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۳ دانشیار گوارش و کبد بالغین، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۴ استادیار ایمونولوژی بالینی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: f8forouzesah@gmail.com

طراحی جفت پرایمر اختصاصی جهت بررسی بیان ژن NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن

چکیده

زمینه: بیماری سلیاک یک اختلال مزمن گوارشی است که در افراد مستعد از لحاظ ژنتیکی به علت مصرف پروتئین گلوتن موجود در گندم، جو و چاودار موجب التهاب می شود. یکی از ژن هایی که در مسیر التهابی بیماری افزایش بیان دارد، ژن NFkB1 است. لذا هدف از انجام این مطالعه طراحی جفت پرایمر اختصاصی جهت بررسی بیان ژن NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن در مقایسه با افراد سالم بود.

روش کار: در این مطالعه ابتدا تعداد ۱۰ نمونه بیوپسی از بیماران مبتلا به سلیاک و ۱۰ نمونه از فرد سالم جمع آوری شد. جفت پرایمر اختصاصی ژن طراحی و پس از تایید با نرم افزار بلاست، تعیین دما و اختصاصیت آن مورد استفاده قرار گرفت. سپس cDNA ساخته شده جهت کمی نمودن بیان ژن NF-kB1 با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه تعداد ۳ نفر (۳۰٪) زن و ۷ نفر (۷۰٪) مرد در گروه بیمار با میانگین سنی $34/80 \pm 5,11$ و تعداد ۴ نفر (۴۰٪) زن و ۶ نفر (۶۰٪) مرد در گروه شاهد با میانگین سنی $38/12 \pm 4,50$ بررسی شدند. با توجه به رعایت رژیم حداقل یک ساله در بیماران این مطالعه، بیان ژن NF-kB1 در بیماران دارای رژیم در مقایسه با افراد سالم کاهش یافته بود ($P=0/45$).

نتیجه گیری: با توجه به این مطالعه رعایت رژیم فاقد گلوتن بیش از یک سال در پایین آمدن میزان بیان ژن های التهابی از جمله NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک موثر است.

واژگان کلیدی: سلیاک، NF-kB1، رژیم فاقد گلوتن

مقدمه

بیماری سلیاک یک اختلال مزمن گوارشی است که در افرادی که از لحاظ ژنتیکی مستعد هستند و به علت مصرف گلوتن موجود در گندم، جو و چاودار حاصل می شود. اصطلاح سلیاک که اشاره به اساس هضم دارد برای اولین بار توسط پزشک یونانی به نام آرتوس شرح داده شد. او سلیاک را به عنوان یک اختلال روده ای همراه با سوء جذب و اسهال معرفی کرد (۱). با ورود گلوتن به سلول های روده، پاسخ ایمنی ایجاد شده که متعاقب این واکنش التهابی در روده ی کوچک، ارتشاح لنفوسیتی، هیپر پلازی مخاط و تخریب ریز پرزها صورت می گیرد. با رژیم غذایی فاقد گلوتن، بهبود بالینی و بافت شناسی در بیماران حاصل می شود (۲). شیوع این بیماری در ایران و جهان حدود ۱ درصد گزارش شده است (۳). بیماری سلیاک یک اختلال چند ژنی است که ژن های HLA کلاس II آن در ۸۵ تا ۹۸ درصد از افراد بروز می کند. این بیماری در حدود ۹۵٪ با HLA از زیر گروه DQ2 و مابقی با HLA از زیر گروه DQ8 در ارتباط می باشد (۴). با ارائه گلوتن توسط گیرنده های (DQ2, DQ8) سطح سلول های پردازنده آنتی ژن به سلول های T باعث ایجاد پاسخ های التهابی می شود (۵). در بیماری سلیاک و اختلالات التهابی روده که از گلوتن مشتق می شود، بیان بالای ژن هایی که باعث التهاب هستند، مشاهده می شود. یکی از گروه های ژنی دخیل در پاسخ های التهابی، ژن های خانواده NF-kB می باشد. در پستانداران خانواده NF-kB از فاکتورهای رونویسی بوده و شامل: NF-kB1, NF-kB2, RelA, RelB, c-Rel می باشد (۶). پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی و همچنین توسعه و نگهداری سلول ها و ارگان هایی که سیستم ایمنی را تشکیل می دهند، در مراحل مختلف تحت کنترل خانواده فاکتورهای رونویسی NF-kB قرار دارند (۶). ژن NFkB1 پروتئین ۱۰۵ کیلو دالتونی را کدگذاری می کند که توسط پردازش با پروتئوزوم ۲۶ تبدیل به پروتئین ۵۰ کیلودالتونی می شود که دارای جایگاه اتصال به DNA است (۷). ژن NFkB1 عامل رونویسی است که توسط عوامل خارجی و داخلی مانند سایتوکاین های التهابی فعال می شود و فعال شدن نامناسب NFkB1 با تعدادی از بیماری های التهابی همراه است (۶). NF-kB مسئول رونویسی ژن های تعدادی از سایتوکاین های پروتئین التهابی و شیمیایی می باشد. همچنین ژن NF-kB یک واسطه اصلی برای IL-15 است که قادر به کاهش سطح Claudin-2 در ساختارهای اتصالات سلول های اپیتلیال بوده و موجب افزایش نفوذ پذیری اپیتلیال روده می شود (۸) با توجه به اهمیت پروسه التهابی در بیماری سلیاک و نقش ژن NF-kB1 در ایجاد آسیب مخاطی و علائم بیماری، هدف از انجام این مطالعه طراحی جفت پرایمر اختصاصی جهت بررسی

بیان ژن NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن در مقایسه با افراد سالم بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه: در مطالعه مورد- شاهد حاضر، ۱۰ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک که به پژوهشکده گوارش و کبد بیمارستان طالقانی مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص براساس آزمایش های سرولوژی و پاتولوژی بود. بر این اساس، بیوپسی دوازدهه از بیماران مبتلا به سلیاک در طی آندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی گرفته شد. در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک باید در زمان تشخیص آنتی بادی های ضد اندومیزیال (EMA) یا ضد ترانس گلوتامیناز بافتی anti-transglutaminase-2 (anti-TG2) مثبت باشند و در مطالعه بافت شناسی با توجه به طبقه بندی مارش، باید آتروفی پرز، هایپر پلازی کریپت و افزایش لنفوسیت های اپیتلیال گزارش شوند (۹). بیماران مورد بررسی در این مطالعه، حداقل به مدت یک سال تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن بودند. در این مطالعه تعداد ده نفر شخص سالم به عنوان کنترل در نظر گرفته می شوند. اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران توسط پرسشنامه جمع آوری و از افرادی که برای بررسی ژن های NF-kB1 کاندید شده بودند رضایت نامه اخذ شد.

استخراج RNA از بافت: جهت بررسی میزان بیان ژن NF-kB1 در بافت روده بیماران و افراد سالم RNA موجود در این بافت توسط کیت یکتا تجهیز (Total RNA Extraction mini Kit) استخراج شده و کیفیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nano Drop بررسی شد. سنتز cDNA از RNA استخراج (کیت تجاری شرکت TaKaRa با نام PrimerScript™ RT Reagent Kit Perfect Real Time) و طبق پروتکل تهیه شد.

سنتز پرایمر: اطلاعات سکانس ژن مورد نظر از سایت NCBI دریافت و توسط نرم افزار Gene Runner، پرایمرها طراحی شدند و از طریق سایت Ncbi.nlm.nih.gov، بلاست شدند.

ژن $\beta(2M)$ به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب و به همراه پرایمرهای طراحی شده به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱- درج گردید.

واکنش PCR: همان طور که در جدول ۲- نشان داده شده است برای شناسایی ژن NFkB1 از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از کیت Mastermix تجاری (YTA PCR Mastermix, Yekta Tajhiz Azma, Tehran, Iran) انجام شد.

جدول شماره ۱ مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	دمای ذوب پرایمر	درصد GC
NF-kB1 Forward	AGAAGAAGTGCAGAGGAAACGT	۲۲	۵۸/۳۹	۴۵
NF-kB1 Reverse	CCACCGCCACTACCAACAT	۲۰	۵۹/۳۵	۵۵
β2m Forward	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	۲۵	۵۹/۷۰	۴۰
β2m Reverse	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	۲۲	۶۲/۱۲	۵۵

جدول شماره ۲ برنامه دمایی ژن NFkB1 برای انجام PCR

تکرار	زمان	دما	مراحل
۴۰ سیکل	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد	مرحله اول دناتوراسیون
۴۰ سیکل	۴۰ ثانیه ۴۰ ثانیه ۴۰ ثانیه ۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد گرادیانت دمایی (۶۵-۵۵) درجه سانتیگراد ۷۲ درجه سانتیگراد ۷۲ درجه سانتیگراد	مرحله دوم PCR

جدول شماره ۳ برنامه دمایی ژن NF-kB1 در دستگاه Real Time

تکرار	زمان	دما	مراحل
۱ سیکل	۱۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد	مرحله اول دناتوراسیون اولیه
۳۹ سیکل	۵ ثانیه ۴۰ ثانیه ۴۰ ثانیه Melt Curve	۹۵ در سانتیگراد ۵۹ درجه سانتیگراد ۷۲ درجه سانتیگراد	مرحله دوم (Real-Time PCR) مرحله سوم

متغیر مورد بررسی و با استفاده از آزمون t test و ANOVA در نرم افزار Prism نسخه ۵/۰۴ مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

بیماران مبتلا به سلیاک مورد بررسی در این آزمایش شامل ۷ نفر مرد و ۳ نفر خانم با میانگین سنی ۳۴/۸۰±۵/۱۱ بودند. افراد گروه کنترل نیز شامل ۶ نفر مرد و ۴ نفر خانم با میانگین سنی ۳۸/۱۲±۴/۵۰ بودند. بیشترین شکایت اصلی بیماران به ترتیب نفخ، کاهش وزن، اسهال مزمن و خستگی بود. علائم خارج روده‌ای شایع در این بیماران عبارت از کاهش وزن، کم‌خونی، خستگی و دیابت بود.

از مشاهده محصول PCR بر روی ژل می‌توان نتیجه گرفت که در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد واضح‌ترین باند و با توجه به لدر و طول قطعه (۱۱۱bp)، در مکانی درست باند تشکیل شده است (شکل - ۱).

نتایج حاصل از بررسی داده‌های Real Time PCR بیانگر این بود که میانگین بیان ژن NF-kB1 در گروه بیماران ۱/۰۳۹ و

در این فرآیند حجم کل، ۲۵ میکرو لیتر در نظر گرفته شد که شامل ۳ لاند بافر، ۰/۷۵ لاند آنزیم Taq و dNTP، ۰/۵ لاند از هر پرایمر Forward/ Reverse، ۱۸/۵ لاند آب دیونیزه و در آخر ۱ لاند نمونه به حجم نهایی اضافه می‌کنیم.

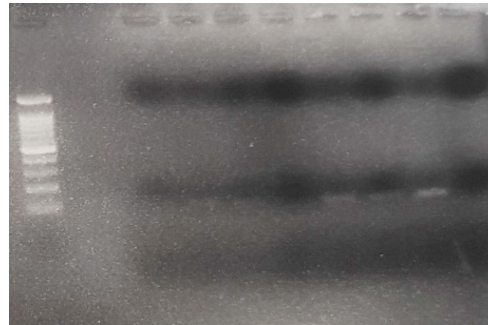
محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ قرار گرفتند و با اتیدیوم برومید رنگ شدند، تا اندازه مخصوص محصولات PCR amplified توسط الکتروفورز ژل تأیید شود.

واکنش Real Time PCR: جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن التهابی NF-kB1 در نمونه‌های بافتی از روش Real Time PCR استفاده شد. تهیه مخلوط واکنش، طبق پروتکل کیت BioFACT™ 2X Real-Time PCR Master Mix, Low ROX (Including SYBR® Green I) شرکت BioFACT انجام شد و از دستگاه Rotor Gene در این مطالعه برای تنظیم برنامه دمایی (جدول - ۳) استفاده شد.

پس از تعیین میزان دما و غلظت اجزای Real Time PCR، منحنی استاندارد رسم گردید و بیان ژن تعیین شد. نتایج حاصل در دو گروه نمونه افراد سالم و بیماران سلیاک دارای رژیم از نظر توزیع

NC 55 56 57 58 59 60

500bp ←
100bp ←



شکل ۱. عکس ژل نمونه های مورد بررسی با روش PCR

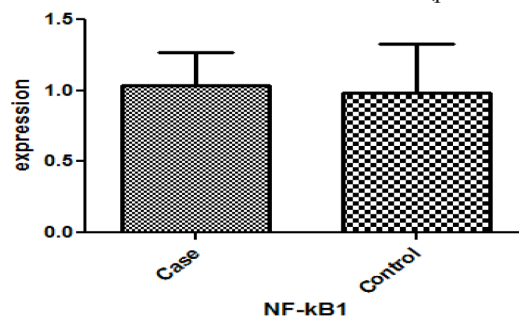
دارای رژیم عاری از گلوتن بودند در مقایسه با افراد سالم کاهش پیدا کرده و تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بیماری سلیاک یک اختلال روده کوچک ناشی از پاسخ سیستم ایمنی به گلوتن است (۱۰) که باعث ایجاد پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی می شود (۱۱). پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی و همچنین توسعه و نگهداری سلول ها و ارگان هایی که سیستم ایمنی را تشکیل می دهند، در مراحل مختلف تحت کنترل خانواده فاکتورهای رونویسی NF-kB قرار دارند (۱۲).

Maiuri و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در بررسی پروتئین ژن NFkB1 با آنالیز وسترن بلات نشان دادند که بیان ژن NF-kB1 در بیوپسی روده بیماران بدون رژیم نسبت به افراد سالم افزایش معنی داری داشته است (۱۳). در بیماری سلیاک، تحریک سلول های NK توسط Th1 باعث تولید سایتوکاین های پیش التهابی مانند TNF- α , TNF- γ , IL-1 β می شود که خود در نهایت باعث شروع مسیر التهابی NF-kB می شود (۱۴).

Fernandez-Jimenez و همکارانش در سال ۲۰۱۳، ۱۶ نمونه بافت بیمار و ۱۶ نمونه بافت افراد سالم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان NFkB1 در بیماران به علت اینکه این ژن از زیر واحد های مسیر التهابی NF-kB بوده، افزایش پیدا کرده است (۱۵).

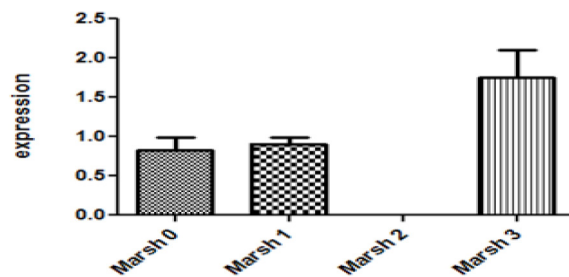
NF-KB در حالت غیر فعال به همراه پروتئین مهار کننده I κ B α در داخل سیتوزول تشکیل کمپلکس می دهد. سیگنال های خارجی متعددی می توانند سبب فعال شدن کیناز (IKK) شود که سبب فسفریله شدن پروتئین I κ B می شود (۱۶). این فسفریلاسیون باعث یوبی کویتینه شدن I κ B و جدا شدن آن از NF-KB و در نهایت تجزیه I κ B α توسط پروتازوم می شود. سپس NF-KB فعال شده به داخل هسته منتقل می شود و در آن جا روی توالی خاصی قرار می گیرد و شروع به رونویسی از ژن التهابی می کند و به این ترتیب سبب تغییر در عملکرد

میانگین بیان ژن NF-kB1 در گروه افراد سالم ۰/۹۸۷ بود که بر این اساس تفاوت معنی داری در بیان ژن NF-kB1 در دو گروه کنترل و بیماران دارای رژیم وجود نداشت (شکل ۱). (p value: ۰/۴۵)



شکل ۲: مقایسه بیان ژن NF-kB1 در افراد سالم و بیماران دارای رژیم فاقد گلوتن

همچنین در بررسی انجام شده بیشتر افراد مورد بررسی در گروه مارش ۳ قرار داشتند که با آنالیز های آماری انجام شده بین طبقه بندی مارش و میزان بیان ژن NF-kB1 تفاوت معنی داری (p value: ۰/۰۶) مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۳: تفاوت بیان ژن NF-kB1 در طبقه بندی مارش بیماران

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که جفت پرایمر طراحی شده بطور اختصاصی می تواند ژن مورد نظر را تکثیر نماید. از طرفی بیان ژن التهابی NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک که

فاقد گلوتن جهت مطالعه تاثیر رژیم و تایید پرایمرهای طراحی شده، مورد بررسی قرار گرفت. با نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که رعایت کامل رژیم عاری از گلوتن می تواند باعث کاهش سطح بیان ژن های التهابی شود. از آنجاییکه آنالیز مولکولی ژن های مسیرهای التهابی، می تواند بیانگر چگونگی ایجاد و پیشرفت بیماری سلیاک باشد، مطالعه ای با بررسی ژن های دیگر که در این مسیر دخیل می باشند، پیشنهاد می گردد.

سلول می شود (۱۷).

Romero-Garmendia و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی ۲۸ نمونه از بیماران مبتلا به سلیاک، آزمایش Real Time PCR و وسترن بلات انجام دادند. در این مطالعه بیان چندین ژن به همراه ژن NFkB1 بررسی شد و محققین به این نتیجه رسیدند که بیان ژن NFkB1 در بیماران افزایش چشمگیری داشته است (۱۸).

در مطالعه حاضر سطح بیان ژن NFkB1 در بیماران تحت رژیم

مراجع

1. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):294-302.
2. Rostami Nejad M, Rostami K, Pourhoseingholi MA, Nazemalhosseini Mojarad E, Habibi M, Dabiri H, et al. Atypical presentation is dominant and typical for coeliac disease. *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18(3):285-91.
3. Rostami Nejad M, Rostami K, Emami M, Zali M, Malekzadeh R. Epidemiology of celiac disease in iran: a review. *Middle East J Dig Dis*. 2011;3(1):5-12.
4. Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(3):695-9.
5. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(9):647-55.
6. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Res*. 2011;21(2):223-44.
7. Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*. 1999;1999(5):RE1.
8. Stone KP, Kastin AJ, Pan W. NFkB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(1):115-24.
9. N Marsh M, W Johnson M, Rostami K. Mucosal histopathology in celiac disease: a rebuttal of Oberhuber's sub-division of Marsh III. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8(2):99-109.
10. Rostami Nejad M. Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity; Evidences and Differences. *International Journal of Celiac Disease*. 2013;1(1):6-7.
11. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(10):1538-44; quiz 1537, 1545.
12. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-80.
13. Maiuri MC, De Stefano D, Mele G, Fecarotta S, Greco L, Troncone R, Carnuccio R. Nuclear factor kappa B is activated in small intestinal mucosa of celiac patients. *J Mol Med (Berl)*. 2003;81(6):373-9.
14. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*. 2007;130(5):918-31.
15. Fernandez-Jimenez N, Castellanos-Rubio A, Plaza-Izurieta L, Irastorza I, Elcoroaristizabal X, Jauregi-Miguel A, et al. Coregulation and modulation of NFkB-related genes in celiac disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. *Hum Mol Genet*. 2014;23(5):1298-310.
16. Liu S, Chen ZJ. Expanding role of ubiquitination in NF-κB signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):6-21.
17. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(6):280-8.
18. Romero-Garmendia I, Garcia-Etxebarria K, Hernandez-Vargas H, et al. Transcription Factor Binding Site Enrichment Analysis in Co-Expression Modules in Celiac Disease. *Genes (Basel)*. 2018; 9(5):245.