مقاله تحقیقی

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

یاسمن حاجی نبی[1]، فلورا فروزش[2*]، محمدجواد احسانی اردکانی[3]، محمد رستمی نژاد[4]

[1] دانشجو کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[2] استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فنآوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[3] دانشیار گوارش و کبد بالغین، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[4] 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: f8forouzesh@gmail.com

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 می‌شود. یکی از ژن‌هایی 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.

یافته‌ها: در این مطالعه تعداد ۳ نفر (۳۰%) زن و ۷ نفر (۷۰%) مرد در گروه بیمار با میانگین سنی ۵,۱۱±۳۴/۸۰ و تعداد ۴ نفر (۴۰%) زن و ۶ نفر (۶۰%) مرد در گروه شاهد با میانگین سنی ۴,۵۰±۳۸/۱۲ 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=۰/۴۵).

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

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

[Downloaded from jmciri.ir on 2026-11-11]

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 سلول‌های روده، پاسخ ایمنی ایجاد شده که متعاقب این واکنش التهابی در روده ی کوچک، ارتشاح لنفوسیتی، هیپر پلازی مخاط و تخریب ریز پرزها صورت می‌گیرد. 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 ژن‌های HLA کلاس II آن در ۸۵ تا ۹۸ درصد از افراد بروز می‌کند. این بیماری در حدود ۹۵% با HLA از زیر گروه DQ2 و مابقی با HLA از زیر گروه DQ8 در ارتباط می‌باشد(۴). با ارائه گلوتن توسط گیرنده‌های (DQ2,DQ8) سطح سلول های پردازنده آنتی ژن به سلول‌های T باعث ایجاد پاسخ های التهابی می شود(۵). در بیماری سلیاک و اختلالات التهابی روده که از گلوتن مشتق می‌شود، بیان بالای ژن‌هایی که باعث التهاب هستند، مشاهده می‌شود. یکی از گروه‌های ژنی دخیل در پاسخ‌های التهابی، ژن‌های خانواده NF-kB می‌باشد. در پستانداران خانواده NF-kB از فاکتورهای رونویسی بوده و شامـــل : NF-kB1, NF-kB2, RelA, RelB, c-Rel می‌باشد (۶). پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی و همچنین توسعه و نگهداری سلول‌ها و ارگان‌هایی که سیستم ایمنی را تشکیل می‌دهند، 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 S۲۶ تبدیل به پروتئین ۵۰ کیلودالتونی می‌شود که دارای جایگاه اتصال به DNA است(۷). ژن NFkB1 عامل رونویسی است که توسط عوامل خارجی و داخلی مانند سایتوکاین های التهابی فعال می‌شود و فعال شدن نامناسب NFkB1 با تعدادی از بیماری‌های التهابی همراه است (۶). NF-kB مسئول رونویسی ژن‌های تعدادی از سایتوکاین‌های پروتئین التهابی و شیمیایی می‌باشد. همچنین ژن NF-kB یک واسطه اصلی برای IL-15 است که قادر به کاهش سطح Claudin-2 در ساختارهای اتصالات سلول‌های اپیتلیال بوده و موجب افزایش نفوذ پذیری اپیتلیال روده می‌شود (۸) با توجه به اهمیت پروسه التهابی در بیماری سلیاک و نقش ژن NF-kB1 در ایجاد آسیب مخاطی و علایم 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 روش‌ها

جمع‌آوری 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 درطی آندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی گرفته شد. در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک باید در زمان تشخیص آنتی بادی‌های ضد اندومیزیال (EMA) یا ضد ترانس گلوتامیناز بافتی (anti-TG2) anti-transglutaminase-2 مثبت باشند و در مطالعه بافت‌شناسی با توجه به طبقه‌بندی مارش، باید آتروفی پرز، هایپر پلازی کریپت و افزایش لنفوسیت‌های 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 می‌شوند. اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران توسط پرسشنامه جمع‌آوری و از افرادی که برای بررسی ژن‌های 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 (for Blood/Cultured Cell/Tissue 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 β(2M) به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب و به همراه پرایمرهای طراحی شده به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. توالی پرایمر ها 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 پلیمراز (PCR) با استفاده از کیت Mastermix تجاری (YTA PCR Mastermix، Yekta Tajhiz Azma، Tehran، Iran) انجام شد.

[Downloaded from jmciri.ir on 2026-11-11]

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	CCACCGCCACTACCAAACAT	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

مراحل	دما	زمان	تکرار
مرحله اول دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتیگراد	۱۰ دقیقه	۴۰ سیکل
مرحله دوم PCR	۹۵ درجه سانیگراد گرادیانت دمایی (۵۵-۶۰)درجه سانتیگراد ۷۲ درجه سانتیگراد ۷۲ درجه سانتیگراد	۴۰ ثانیه ۴۰ثانیه ۴۰ ثانیه ۱۰ دقیقه	۴۰ سیکل

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

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

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

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵% قرار گرفتند و با اتیدیوم بروماید 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 سلیاکی دارای رژیم از نظر توزیع متغیر مورد بررسی و با استفاده از آزمون t test و ANOVA در نرم افزار Prism نسخه ۵/۰۴ مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

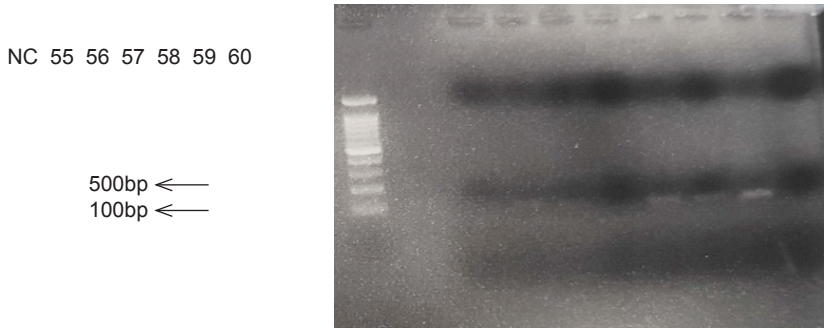
یافته‌ها

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

از مشاهده محصول PCR برروی ژل می توان نتیجه گرفت که در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد واضح ترین باند و با توجه به لدر و طول قطعه (bp111)، در مکانی درست باند تشکیل شده است (شکل - ۱).

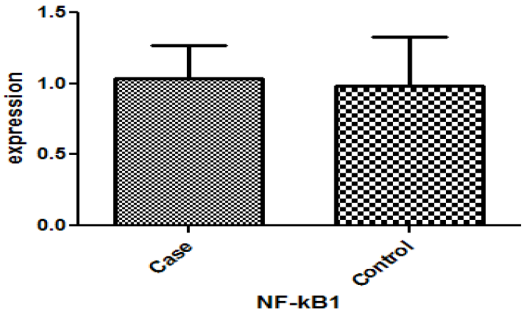
نتایج حاصل از بررسی داده های Real Time PCR بیانگر این بود که میانگین بیان ژن NF-kB1 در گروه بیماران ۱/۰۳۹ و

[Downloaded from jmciri.ir on 2026-11-11]



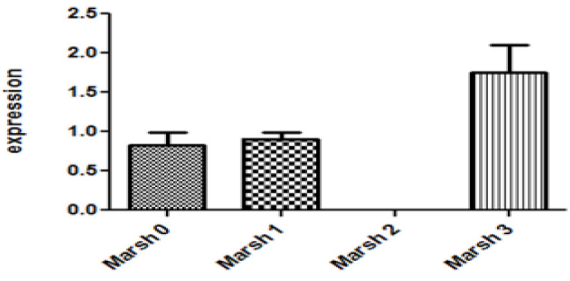
شکل ۱. عکس ژل نمونه های مورد بررسی با روش PCR

میانگین بیان ژن NF-kB1 در گروه افراد سالم ۰/۹۸۷ بود که بر این اساس تفاوت معنی‌داری 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 طبق طبقه بندی مارش و میزان بیان ژن NF-kB1 تفاوت معنی‌داری (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 می‌تواند ژن مورد نظر را تکثیر نماید. از طرفی بیان ژن التهابی NF-kB1 در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک که دارای رژیم عاری از گلوتن بودند در مقایسه با افراد سالم کاهش پیدا کرده و تفاوت معنی‌داری 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 واکتسابی 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 معنی‌داری داشته است (۱۳). در بیماری سلیاک، تحریک سلول‌های NK توسط Th1 باعث تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند IL-1β, TNF-α, TNF-γ می شود که خود در نهایت باعث شروع مسیر التهابی NF-kB می‌شود(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 مهاری IκBα در داخل سیتوزول تشکیل کمپلکس می‌دهد. سیگنال‌های خارجی متعددی می‌توانند سبب فعال شدن کیناز (IKK) شود که سبب فسفریله شدن پروتئین IκB می‌شود(۱۶). این فسفریلاسیون باعث یوبی کویتینه شدن IκB و جدا شدن آن از NF-KB و در نهایت تجزیه IκBα توسط پروتئازوم می‌شود. سپس NF-KB فعال شده به داخل هسته منتقل می‌شود و در آن جا روی توالی خاصی قرار می‌گیرد و شروع به رونویسی از ژن التهابی می کند و به این ترتیب سبب تغییر در عملکرد

[Downloaded from jmciri.ir on 2026-11-11]

سلول می‌شود(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 فاقد گلوتن جهت مطالعه تاثیر رژیم و تایید پرایمرهای طراحی شده، مورد بررسی قرار گرفت. با نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که رعایت کامل رژیم عاری از گلوتن می‌تواند باعث کاهش سطح بیان ژن‌های التهابی شود. ازآنجاییکه آنالیز مولکولی ژن‌های مسیرهای التهابی، می‌تواند بیانگر چگونگی ایجاد و پیشرفت بیماری سلیاک باشد، مطالعه‌ای با بررسی ژن‌های دیگر که در این مسیر دخیل می‌باشند، پیشنهاد می‌گردد.

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 Gastrointestin 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. NFκB 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 NFκB-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.

[Downloaded from jmciri.ir on 2026-11-11]