

## Cytotoxicity Effect of Recombinant Outer Membrane Inflammatory Protein (oipA) of *Helicobacter pylori* on a Breast Cancer Cell Line

Neda Soleimani<sup>1</sup>, Ashraf Mohabati Mobarez<sup>2\*</sup>, Omid Teymournejad<sup>3</sup>, Katayoun Borhani<sup>1</sup>

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Bacteriology, School of Medical, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 03/Mar/2014, Accepted: 16/Jul/2014

### Abstract

**Objective:** Breast cancer is one of the leading causes of death in women worldwide. Conventional treatments use cytotoxic drugs which have high numbers of side effects. Currently pharmacologists are searching for novel drugs with fewer side effects and maximum efficiency as breast cancer treatment. The aim of the current study is to clarify the cytotoxicity effect of the recombinant outer membrane inflammatory protein (oipA) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) on a breast cancer cell line.

**Methods:** We purified recombinant *H. pylori* oipA by Ni-NTA affinity chromatography. Breast cancer cells (4T1) were treated with different concentrations of recombinant oipA for various lengths of time. Cell viability was evaluated by the viability assay (MTT test).

**Results:** SDS-PAGE analysis showed the expression of an approximately 34000 dalton protein. Statistical analysis showed oipA toxic effects on 4T1 cells at a concentration of 250 µg/ml after 24 h.

**Conclusion:** These findings suggested that oipA had a direct toxic effect on a breast cancer cell line (4T1) in vitro. The oipA protein might be a new tool for future therapeutic strategies in cancer immunotherapy.

**Keywords:** 4T1 cell, Viability, Outer inflammatory protein A, Breast cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 57-66

# اثر توکسیک پروتئین نو ترکیب غشای خارجی التهابی (oipA) هلیکوباکتر پیلوری بر رده سلولی سرطانی سینه

ندا سلیمانی<sup>۱</sup>، اشرف محبتی مبارز<sup>۲\*</sup>، امید تیمورنژاد<sup>۳</sup>، کتابون برهانی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی

Email: mmmobarez@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۵

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۱۲

## چکیده

**هدف:** سرطان سینه از علل عمده مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. درمان‌های دارویی متعارف با استفاده از داروهای سیتوتوکسیک دارای سطح بالایی از عوارض جانبی برای بیمار است. امروزه محققین به دنبال درمان جایگزین با آثار جانبی کم و حداکثر بهره‌وری هستند. oipA یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های غشای خارجی هلیکوباکتر پیلوری است. هدف این مطالعه بررسی اثر توکسیسیته پروتئین نو ترکیب غشای خارجی التهابی (oipA) هلیکوباکتر پیلوری بر رده سلولی سرطانی سینه در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها:** بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب OipA با استفاده از ستون نیکل انجام شد. از واکنش آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد پیکره هلیکوباکتر پیلوری با باندهای پروتئینی برای اثبات حضور پروتئین استفاده شد. سلول‌های سرطانی سینه 4T1 با غلظت‌های مختلف پروتئین تیمار شد. میزان بقای سلولی با آزمون MTT سنجیده شد.

**نتایج:** واکاوی SDS-PAGE بیان پروتئین را تأیید کرد. اندازه پروتئین بیان شده ۳۴۰۰۰ دالتون بود. نتایج آزمون MTT در زمان ۲۴ ساعت نشان داد که پروتئین OipA در غلظت ۲۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی سینه 4T1 دارای اثر سیتوتوکسیک است.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه اثر توکسیک پروتئین OipA مشاهده شد. OipA به‌طور مستقیم بر سلول‌های سرطانی سینه اثر توکسیک دارد. این پروتئین ممکن است به‌عنوان یک ابزار جدید برای راه‌کارهای درمانی در آینده برای درمان سرطان مطرح باشد.

**کلیدواژگان:** سلول‌های 4T1، بقای سلولی، پروتئین نو ترکیب غشای خارجی التهابی، سرطان سینه

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۵۷-۶۶

## مقدمه

سرطان سینه (Breast cancer) شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. هرچند ایران یکی از کشورهایی است که میزان بروز سرطان پستان کمتری نسبت به

سرطان در نتیجه تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌ها به‌وجود می‌آید که آثار عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی مسبب آن است. علاوه بر مواد شیمیایی، اشعه آفتاب، امواج ماورای بنفش، ویروس‌ها و باکتری‌ها در تولید سرطان‌ها نقش مهمی را دارند.

## اثر توکسیستی OipA روی سرطان سینه

پروتئین‌ها و توکسین‌های باکتریایی و ... در درمان سرطان‌ها مورد توجه واقع شده است. هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*)، باکتری گرم منفی است که به واسطه گیرنده‌های موجود در سطح خود، به سلول‌های اپی‌تلیال معده متصل می‌شود. OipA (Outer Inflammatory Protein A) یکی از پروتئین‌های غشای خارجی باکتری است که در فرآیند التهاب نقش دارد [۸]. این پروتئین یکی از عوامل بیماری‌زایی و دارای خاصیت آنتی‌ژنی بالا است و افزایش سطح سرمی اینترلوکین ۸ (Interleukin 8: IL-8) را سبب می‌شود [۹-۱۲]. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است که این پروتئین در اتصال و کلونیزه شدن هلیکوباکتر پیلوری نقش دارد [۱۳]. مطالعات بسیار محدودی در زمینه شناخت این پروتئین وجود دارد. بررسی‌های مولکولی در زمینه معرفی این پروتئین در حالت طبیعی، نشان دهنده آن است که این پروتئین باکتریایی نقش مؤثری در ایجاد التهاب معده و نقش مهمی در عملکرد سلول‌های دندریتیک دارد؛ اما جنبه‌های کاربردی این پروتئین بررسی نشده است. نتایج مطلوب در مورد این پروتئین نوترکیب، دریچه‌ای نوین در درمان سرطان خواهد بود. از این رو مطالعه حاضر تحقیق در زمینه تولید و معرفی محصولات جدید میکروبی در درمان سرطان است. هدف این مطالعه بررسی اثر کشندگی پروتئین نوترکیب غشای خارجی التهابی (OipA) هلیکوباکتر پیلوری بر رده سلولی سرطانی سینه در شرایط آزمایشگاهی است.

## مواد و روش‌ها

### کلونینگ و ترانسفرماسیون

ناقل Pet28a حامل ژن *oipA* از دانشگاه تربیت مدرس گروه باکتری‌شناسی پزشکی تهیه شد. ژن *oipA* توسط PCR تکثیر شد. از ناقل Pet28a برای کلونینگ و بیان استفاده شد. محصولات PCR و ناقل Pet28a توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I (Fermentas، لیتوانی) هضم شد. عمل الحاق در دمای

بقیه کشورها دارد، افزایش میزان بروز آن در سال‌های اخیر، این بیماری را به‌عنوان رایج‌ترین بدخیمی در میان زنان ایرانی نشان داده است. بروز این بیماری در ایران حدود یک دهه قبل از کشورهای توسعه یافته است و بیش از ۳۰ درصد بیماران زیر ۳۰ سال سن را در بر می‌گیرد [۱]. با وجود روش‌های درمانی مختلف هنوز هم جراحی به‌عنوان اولین روش درمانی برای سرطان سینه محسوب می‌شود. درمان‌های رایج سرطان‌ها ممکن است اندازه تومور را کاهش دهد، اما گذرا بوده و بر بقای بیمار اثر مثبتی ندارد و احتمال عود بیماری هم وجود دارد [۲]. روش‌های درمانی رایج بر مبنای این فرضیه که توده سرطانی جمعیتی همگن است، استوار است [۳] و سلول‌های با تکثیر سریع و تمایز یافته را هدف قرار می‌دهد [۴]. ولی از بیش از یک قرن پیش، سرطان به‌عنوان جمعیت ناهمگن از سلول‌ها از نظر ریخت‌شناختی مطرح شده [۵] و در دهه اخیر نیز تفاوت‌های عملکردی را برای آن‌ها قایل شده‌اند [۳]. در حقیقت بافت سرطانی شامل زیرجمعیت محدودی از سلول‌ها با خواص ویژه است که این سلول‌ها مسئول پیدایش تومور، متاستاز [۶]، عود مجدد و مقاومت به درمان‌های رایج هستند [۷] و نسبت به سایر سلول‌ها توانایی بیشتری برای القای تومور در موش‌های مدل اصلاح شده از نوع نقص سیستم ایمنی را دارند. چنین تنوعی یافتن یک راه‌کار درمانی کلی را برای درمان قطعی امکان‌ناپذیر می‌سازد. با توجه به ماهیت تهاجمی سرطان و همین‌طور سازوکارهای پیچیده دخیل در پیشرفت آن درمان‌های سنتی همچون جراحی، شیمی‌درمانی و رادیودرمانی در بسیاری از موارد ناکارآمد است. عوارض جانبی بالا، اختصاصیت پایین و احتمال بروز مجدد بیماری از محدودیت‌های روش‌های فوق است. بنابراین نیاز به جایگزینی درمان‌هایی مؤثرتر، اختصاصی‌تر و دارای عوارض جانبی کمتر بسیار احساس می‌شود. شیوع بالای سرطان پستان در سنین پایین در ایران و مشکلات ناشی از این بیماری برای خانواده‌ها لزوم بررسی تحقیقات انجام شده در این زمینه را بدیهی می‌سازد. از این‌رو استفاده از محصولات باکتریایی شامل

۴ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas، لیتوانی) انجام شد و به میزبان کلونینگ *E. coli* DH5a ترانسفرم شد.

## القا و بیان پروتئین نو ترکیب OipA

به منظور بیان پروتئین نو ترکیب OipA، از میزبان بیانی *E. coli* BL21 استفاده شد. برای غربالگری توانایی بیان باکتری‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب رشد یافته روی LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Mast، انگلستان)، کشت مجزای کلونی در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین تهیه و در انکوباتور با حرکت دورانی (۲۰۰ دور در دقیقه) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب گرم‌گذاری شد و از آن‌ها برای کشت مجدد ۱۵ محیط مایع LB با شرایط قبل استفاده شد و زمانی که کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶-۱ رسید، پلاسمیدهای نو ترکیب با ۱ میلی‌مولار ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (-Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) (Fermentas، لیتوانی) القا شد. پنج نمونه در زمان‌های صفر، یک، دو، سه، چهار و پنج ساعت از کشت باکتری‌های القا شده تهیه و میزان بیان پروتئین در زمان‌های مختلف با کمک روش SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) در ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل آمید و ولتاژ ۱۰۰، در حضور نشانگر وزن مولکولی [Fermentas (لیتوانی) و ۲۰۰ Ladder] کیلودالتون استفاده شد. در نهایت ژل پلی‌اکریل آمید با رنگ کوماسی G-250 (Fermentas، لیتوانی) رنگ‌آمیزی و باند مورد نظر بررسی شد [۱۲، ۱۳].

از آن جایی که در ناقل مورد استفاده His-tag تعبیه شده بود و با توجه به آغازگر (Primer) طراحی شده، از رزین نیکل (BioVision، کالیفرنیا) تمایلی برای خالص‌سازی پروتئین استفاده شد. به منظور تهیه لیز سلول، رسوب اشرفیسا کلی کشت داده شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر شستشو

(Washing Buffer) سوسپانسیون شد و توسط سونیکاتور در ۱۰ چرخه ۴۰ ثانیه‌ای با شدت ۹۰ درصد تحت شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد شکسته شد. سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ (۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه) و محلول رویی جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد. پس از عبور محلول رویی پروتئینی شستشوی ستون با بافر B 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 به‌طور جداگانه جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری جزء پروتئینی، واکای الکتروفورز SDS-PAGE به منظور بررسی خلوص آن‌ها انجام شد. به منظور حذف ایمیدازول (Imidazole) از محلول پروتئینی از روش دیالیز تعویض بافر در حضور بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) (Merck، انگلستان) استفاده شد. غلظت نهایی با روش برادفورد (Bradford) ارزیابی شد.

## آزمون لکه‌گذاری وسترن

پروتئین نو ترکیب از ژل SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولوز (Invitrogen، کالیفرنیا) توسط دستگاه بلات (Bio-Rad، آلبانی) در شرایط مرطوب منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتئین از نشانگر پروتئینی از پیش رنگ شده استفاده شد (Fermentas، لیتوانی). مسدودسازی (Blocking) غشای نیتروسلولوز با محلول TBS (Tris-Buffered Saline) (۵۰ میلی‌مولار Tris، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl) حاوی ۵ درصد شیر خشک (Fat free milk) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد غشا با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی علیه 6His-tag (Roche، آلمان) در بافر TBS-T با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. شستشو با بافر TBS-T (TBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) انجام شد. پس از شستشوی نهایی غشا با محلول ۰/۰۶ درصد DAB

## اثر توکسیستی OipA روی سرطان سینه

۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محیط رویی کشت به آرامی برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma-Aldrich، آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان تشکیل شده، حل شود و سبب ایجاد رنگ گردد. میزان جذب چاهک‌ها در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به‌دست آمده بر حسب شاخص تحریک (Stimulation Index: SI) محاسبه شد که SI میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر هر آزمون بر جذب ۵۷۰ نانومتر کنترل منفی است.

## ارزیابی زنده بودن و بقای سلول‌های تیمار شده

بررسی زنده بودن و بقای سلول‌های تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد. بدین‌منظور گروه‌های سلولی مجزای تیمار شده با پروتئین نوترکیب برای ارزیابی تریپسینه شدند. پس از انجام فرآیند شستشو سلول‌ها با نسبت برابر از تریپان بلو رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از لام نئوبار درصد سلول‌های زنده تعیین شد.

## واکاوی آماری

این مطالعه یک مطالعه از نوع مداخله‌ای (Interventional) است. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین گزارش شد و واکاوی آماری داده‌های آزمون‌ها در غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون واکاوی واریانس یک‌طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) بررسی شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS14 و Prism6 بررسی و  $P \leq 0.001$  به‌صورت معنی‌دار تفسیر شد.

## نتایج

### بیان و تخلص پروتئین نوترکیب OipA در

### میزبان *E. coli* BL21

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین در محدوده باند ۳۴

(Diaminobenzidine) (۵۰ میلی‌مولار Tris به همراه یک دهم درصد آب اکسیژنه شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) قرار گرفت و پس از ظهور باند واکنش با آب مقطر متوقف و از آن عکس تهیه شد [۱۴، ۱۵].

## رده سلولی توموری

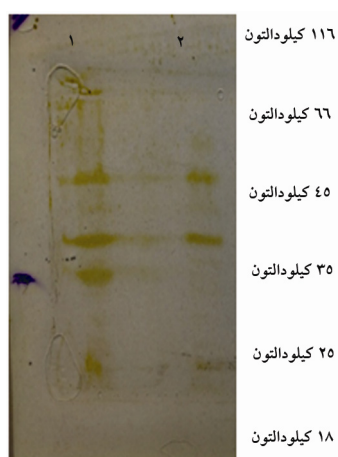
در این مطالعه از رده سلولی موشی سرطانی سینه 4T1 استفاده شد. رده سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران تهیه شد و در شرایط مناسب محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Gibco) کامل حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) کشت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> درصد نگهداری شد تا تعداد مناسب حاصل شود.

## آزمون کشندگی روی رده سلولی توموری

پس از رسیدن سلول‌ها 4T1 به تعداد مناسب، سلول‌ها شمارش شده و سوسپانسیونی به تعداد  $1 \times 10^4$  سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI حاوی مواد مکملی به‌صورت ۲ گرم در لیتر سدیم بی‌کربنات، ۲ میلی‌مولار L-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در آمده و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون درون هر پلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL، کره جنوبی) کشت داده شد. سلول‌های توموری به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> درصد نگهداری شدند تا به پایداری لازم کشت دست یابند. سپس از سریال رقت از غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا غلظت ۳/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین نوترکیب OipA سوسپانسیون شده به‌صورت سه تایی روی سلول‌های توموری اضافه شد و یک گروه بدون تیمار به‌عنوان کنترل منفی کشت و پلیت‌های کشت به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از طی شدن زمان لازم به محیط کشت رویی ۲۰ میکرولیتر [۵ میکروگرم MTT (Merck، انگلستان) در یک میلی‌لیتر PBS] اضافه و به‌مدت

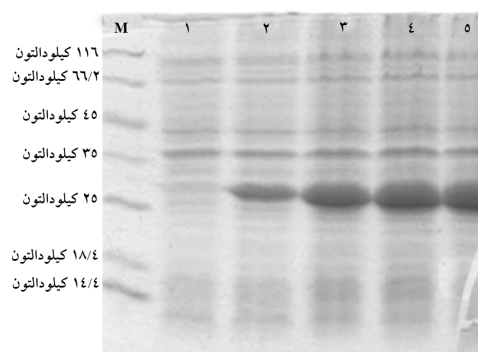
## آزمون لکه گذاری وسترن

برای این منظور در ابتدا پروتئین کل محلول سلول‌های E.coli BL21 القا شده و القا نشده در ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد و پس از انتقال به کاغذ نیتروسولوز، واکنش آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد پیکره هلیکوباکتر پیلوری با باندهای پروتئینی بررسی شد. نتایج حاصل از وسترن بلا تینگ بیان این پروتئین به‌طور اختصاصی تأیید شد (شکل ۳).



شکل ۳ ارزیابی آنتی‌ژنیسیته تیترا پروتئین OipA نو ترکیب در آزمایش لکه‌گذاری وسترن (۱) OipA القا شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG، (۲) OipA القا نشده

کیلو دالتونی نشانگر وزنی را نشان داد. بیان پروتئین OipA از ساعت سوم آغاز شد و در ساعت چهارم به بیشترین مقدار خود رسید؛ بین ساعت پنجم، هفتم و القا شبانه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود داشت. با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نو ترکیب در ساعت چهارم و به‌صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوژن) در فاز رسوبی قرار دارد. براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتئین رسوبی از یک لیتر کشت باکتری حدوداً میزان ۲۷۰ میکروگرم تعیین شد (شکل ۱ و ۲).

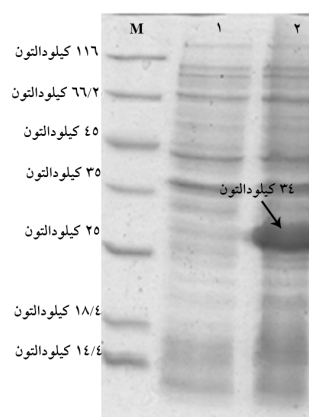


شکل ۱ ارزیابی بیان پروتئین OipA در ژل (۱۲ درصد) SDS-PAGE، چاهک (M) نشانگر با وزن پایین، چاهک (۱) OipA القا نشده، چاهک (۲) OipA القا شده با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در ساعت اول، چاهک (۳) OipA القا شده با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در ساعت دوم، چاهک (۴) OipA القا شده با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در ساعت سوم، چاهک (۵) OipA القا شده با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در ساعت چهارم

## نتایج آزمون کشف‌کنندگی و ارزیابی زنده بودن رده

### سلولی توموری

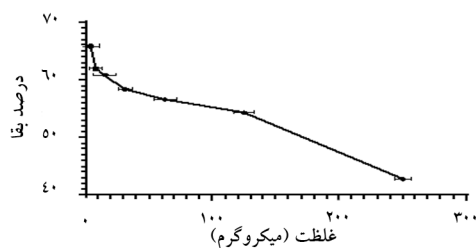
پس از اثر دادن غلظت‌های مختلف از پروتئین نو ترکیب OipA بر سلول‌های 4T1 به مدت ۲۴ ساعت میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از MTT ارزیابی شد. شکل ۴ عکس میکروسکوپ نوری سلول‌های 4T1 بعد از تیمار با بزرگنمایی کل عدسی  $\times 600$  را نشان می‌دهد. آزمون ANOVA نشان می‌دهد که تفاوت بین گروه‌های مختلف از نظر آماری معنی‌دار است ( $P < 0.0001$ ). آزمون تعقیبی (Host hoc) نشان دهنده آن است که میزان زنده بودن سلول‌های توموری در مواجهه با



شکل ۲ ارزیابی بیان پروتئین OipA در ژل (۱۲ درصد) SDS-PAGE؛ چاهک (M) نشانگر با وزن پایین، چاهک (۱) OipA القا نشده، چاهک (۲) OipA القا شده با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در ساعت چهارم

### اثر توکسیستی OipA روی سرطان سینه

داد که در غلظت‌های بالای ۳۰ میکروگرم در میکرولیتر از این پروتئین میزان مرگ و میر به نسبت افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. به‌صورتی که در غلظت ۳۰ میکروگرم در میکرولیتر، بیش از ۵۰ درصد از سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل و شاهد (با میزان زنده بودن ۹۷ درصد) از بین رفته بودند. بررسی زنده بودن سلول‌های تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، نتایج حاصل از آزمون MTT را تأیید کرد و نتایج این دو با هم همپوشانی داشت.

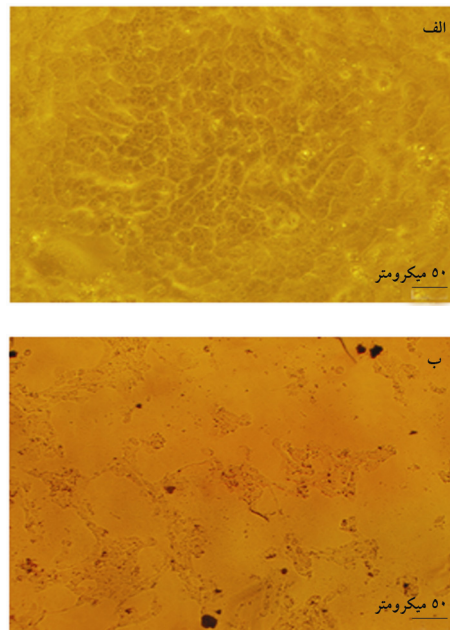


شکل ۵ بررسی میزان بقای سلولی در آزمون MTT به‌صورت SI و درصد بقا ( $P < 0.0001$ )

### بحث

در حال حاضر بیش از ۵۰ درصد بیماری‌های سرطانی قابل‌معالجه است؛ به‌ویژه اگر این بیماری در مراحل اولیه تشخیص داده شود. بیماری‌های سرطان از راه‌های جراحی، شیمی‌درمانی، اشعه‌درمانی، ایمونوتوکسین‌درمانی و استفاده از پروتئین‌های نوترکیب میکروبی یا تلفیقی از آن‌ها قابل درمان است. مطالعات زیادی روی آثار توکسین‌ها بر سلول‌های سرطانی صورت گرفته است و جنبه‌های زیادی از تأثیرات آن مشخص شده است. اما تا کنون مطالعه‌ای در زمینه درمان سرطان با پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری صورت نگرفته است. مطالعه واکنش میزبان و عوامل بیماری‌زایی در محیط آزمایشگاه می‌تواند جنبه‌های نامشخص سازوکار مولکولی این عوامل را بر سلول‌ها بیشتر مشخص کند. امروزه برای مطالعه دقیق‌تر، به بررسی تک تک عوامل ویروالانس و واکنش آن‌ها در محیط

غلظت‌های ۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشتر، حداقل ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی سینه را از بین می‌برد و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان کشندگی دیده می‌شود ( $P < 0.0001$  برای هر دو) که اثر کشندگی این پروتئین وابسته به غلظت و زمان است.



شکل ۴ رده سلول‌های سرطانی سینه 4T1 بدون تیمار (ب) رده سلول‌های سرطانی سینه 4T1 تیمار با پروتئین نوترکیب OipA (میکروسکوپ نوری، با بزرگنمایی نهایی عدسی  $\times 600$ )

از مقایسه داده‌های به‌دست آمده از سنجش درصد حیات سلول‌های سرطانی تیمار شده با پروتئین OipA نوترکیب مشخص شد که تفاوت میانگین درصد حیات سلول‌ها در دوزهای متفاوت در طول زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار معنی‌دار بود. نتایج آزمون MTT سلول‌های سرطانی 4T1 تیمار شده با پروتئین OipA نوترکیب در بازه زمانی ۲۴ ساعت در شکل ۵ ارائه شده است. بررسی زنده بودن و بقای سلول‌های تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی شده در گروه‌های سلولی مجزای تیمار شده با پروتئین نوترکیب در غلظت‌های مختلف در بازه زمانی ۲۴ ساعت نشان

کرد. نتایج وسترن بلات حضور پروتئین نوترکیب را به لحاظ واکنش با آنتی‌بادی اختصاصی اثبات کرد. این نتایج نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب باکتریایی به درستی تولید شده و اندازه آن حدود ۳۴ کیلو دالتون می‌باشد.

در سال ۲۰۱۳ تیمورنژاد و همکاران با بررسی این پروتئین نشان دادند که این عامل باکتریایی سبب مهار سلول‌های دندریتیک و کاهش بیان نشانگرهای CD۴۰ و CD۸۶ می‌شود [۲۴]. اما بررسی کاربرد این پروتئین به‌عنوان یک کاندید درمانی سرطان تاکنون در دنیا انجام نشده است. در این پروژه تأثیر پروتئین OipA نوترکیب بر رشد و تکثیر رده سلولی 4T1 بررسی شد. بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون MTT نشان داد که پروتئین OipA نوترکیب به شیوه‌ای وابسته به زمان و غلظت به‌صورت معنی‌داری بر سلول‌های 4T1 تأثیر می‌گذارد؛ به‌طوری که با افزایش مدت زمان تیمار با پروتئین OipA نوترکیب و نیز بالا رفتن غلظت مورد استفاده از این ترکیب، میزان رشد و بقای سلول‌های 4T1 به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. بنابراین پروتئین OipA نوترکیب موجب کاهش چشمگیر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر پروتئین OipA نوترکیب بر سلول‌های معده رده AGS نشان داد که سلول‌های معده نیز همانند سلول‌های سرطانی سینه از پروتئین OipA نوترکیب تأثیر می‌پذیرند [۲۴].

نتایج مطالعه حاضر که برای اولین بار انجام گرفته است، نشان داد که این پروتئین دارای خاصیت کشندگی بوده و غلظت ۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب القای مرگ در ۵۰ درصد از رده سلول‌های سرطانی سینه مدل متاستاتیک 4T1 در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. میزان سیتوتوکسیسیته روی سلول‌های توموری به‌صورت SI بررسی شد و آزمون ANOVA نشان داد که تفاوت بین گروه‌های مختلف از نظر آماری معنی‌دار است ( $P < 0/0001$ ). با توجه به نتایج به‌دست آمده این پروتئین می‌تواند به‌عنوان ابزاری مناسب و مؤثر برای کاربردهای درمانی برای درمان سرطان در آینده باشد [۱۶، ۱۷].

آزمایشگاه با میزبان پرداخته می‌شود [۲۵]. عوامل بیماری‌زای متعددی برای هلیکوباکتر پیلوری بیان شده است، اما برخی از این عوامل همانند CagA، VacA و OipA تأثیرگذارتر هستند [۱۸، ۱۹]. در سال ۲۰۰۰ در یک مطالعه مشترک بین آمریکا و ژاپن OipA کشف شد. مشاهده شده که این پروتئین باعث افزایش IL-8 در کشت سلولی کارسینومای معده می‌شود [۲۰]. مطالعات محدودی روی نحوه سیگنالینگ داخل سلولی OipA صورت گرفته است تا نحوه تأثیرگذاری آن بر چرخه سلولی مشخص شود [۲۱]. اخیراً برای درک بیشتر از نحوه سیر بیماری به سمت سرطان مطالعات گسترده‌ای درباره تأثیر هلیکوباکتر پیلوری بر عوامل داخل سلولی دخیل در چرخه تکثیر سلول انجام گرفته است که تأثیر باکتری روی افزایش فعالیت تلومراز از آن جمله است.

آثار عواملی همچون CagA و VacA روی سیگنالینگ سلولی بسیار مطالعه شده است. هیرایاما (Hirayama) در سال ۲۰۰۲ با مطالعه عامل VacA آثار سیتوتوکسیسیته آن را اثبات کرد [۲۶]. در سال ۲۰۰۷ هاندا (Handa) و همکاران با بررسی پروتئین CagA مسیر سیگنالینگ آن را در ایجاد تکثیر سلولی، سلول‌های اپیتلیال معده نشان داد [۲۷]. سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ از نانوذرات تری متیل کیتوزان حامل پروتئین نوترکیب Hp.NapA به‌عنوان یک کاندید برای درمان تومور مدل متاستاتیک سرطان سینه استفاده کردند [۲۸]. با این حال هنوز اطلاعات زیادی از نحوه سیگنالینگ داخل سلولی OipA در دسترس نیست. OipA از جمله عوامل کاندید برای درمان سرطان است.

در سال ۲۰۱۲ تیمورنژاد و همکاران از روش بیوانفورماتیک برای بهینه‌سازی کلون ژن مورد نظر در اشریشیا کلی استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد ژن کلون شده با آغازگرهای مهندسی شده صحیح بوده است [۲۲]. در این تحقیق پروتئین التهابی خارجی نوترکیب از هلیکوباکتر پیلوری ساخته شد. بیشترین میزان بیان ژن در حضور IPTG در ساعت چهارم پس از القا بود. نتایج SDS-PAGE آن بیان این پروتئین را تأیید



حیوانی می‌تواند در رسیدن به این هدف مفید باشد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری رشته باکتری شناسی پزشکی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است.

از سوی دیگر؛ افزایش کارایی این پروتئین‌ها در محیط آزمایشگاه و مدل حیوانی مطرح است.

مطالعات تکمیلی و شناخت مسیرهای سیگنالینگ برای روشن شدن نقش این پروتئین نو ترکیب در حال پیگیری و انجام است. محصولات ثانویه باکتریایی با آثار مختلف بر سلول‌های سرطانی و سلول‌های ایمنی در ایجاد پاسخ مناسب برای درمان به‌عنوان یک کاندید مطرح است؛ بنابراین انجام آزمایش‌های

## منابع

- [1] Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
- [2] Tinoco G, Warsch S, Glück S, Avancha K, Montero AJ. Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies. *J Cancer* 2013; 4(2): 117-32.
- [3] Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 2007; 21(14): 3777-85.
- [4] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9339-44.
- [5] Dent S, Oyan B, Honig A, Mano M, Howell S. HER2-targeted therapy in breast cancer: a systematic review of neoadjuvant trials. *Cancer Treat Rev* 2013; 39(6): 622-31.
- [6] Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol* 2002; 3(8): 508-13.
- [7] Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 2006; 86(12): 1203-7.
- [8] Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347(15): 1175-86.
- [9] Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123(2): 414-24.
- [10] Cover TL. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. *J Infect Dis* 2006; 194(10): 1343-5.
- [11] Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad R. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis* 2006; 194(10): 1346-55.
- [12] Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 555.

- [13] Shah C, Khwaja S, Badiyan S, Wilkinson JB, Vicini FA, Beitsch P, Keisch M, Arthur D, Lyden M. Brachytherapy-based partial breast irradiation is associated with low rates of complications and excellent cosmesis. *Brachytherapy* 2013; 12(4): 278-84.
- [14] Bollag DM, Michel DR, Edelstein SJ. Protein methods. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley Liss; 1996.
- [15] John E, Ben M, David W, Paul T. Current protocols in protein science. New York: John Wiley and Sons; 2007.
- [16] Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elios MM, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest* 2006; 116(4): 1092-101.
- [17] D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(2): 157-64.
- [18] Barden S, Lange S, Tegtmeyer N, Conradi J, Sewald N, Backert S, Niemann HH. A helical RGD motif promoting cell adhesion: crystal structures of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system pilus protein CagL. *Structure* 2013; 21(11): 1931-41.
- [19] Ferreira RM, Figueiredo C, Bonet C, Pardo ML, Liso JM, Alonso P, Sala N, Capella G, Sanz-Anquela JM, González CA. *Helicobacter pylori* vacA intermediate region genotyping and progression of gastric preneoplastic lesions. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(1): 145-6.
- [20] Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(13): 7533-8.
- [21] Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol* 2008; 10(4): 1008-20.
- [22] Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Moazzeni SM, Yakhchali B, Eskandari V. In silico prediction of exposure amino acid sequences of outer inflammatory protein A of *Helicobacter pylori* for surface display on *Escherichia coli*. *Indian J Hum Genet* 2012; 18(1): 83-6.
- [23] Tahara E. Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. *Exp Toxicol Pathol* 1998; 50(4-6): 375-8.
- [24] Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Moazzeni SM, Ahmadabad HN. In vitro suppression of dendritic cells by *Helicobacter pylori* OipA. *Helicobacter* 2014; 19(2): 136-43.
- [25] Maeda S. *Helicobacter pylori* virulence factors except CagA. *Nihon Rinsho* 2009; 67(12): 2251-6.
- [26] Hirayama T, Wada A, Yahiro K, Kimura M, Kimura T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55(1): 1-5.
- [27] Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. CagA protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(11): 1697-702.
- [28] Soleimani N, Mohabati-Mobarez A, Atyabi F, Hasan-Saraf Z, Haghghi MA. Preparation of chitosan nanoparticles carrying recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 23(2): 134-44.