



بررسی بیان mRNA سایتوکاین IL-18 در بافت مخاط معده‌ی بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباترپیلوری در استان چهارمحال و بختیاری

نادر باقری^۱، قربانعلی رحیمیان^۲، لقمان سلیم‌زاده^۲، افشین تقی‌خانی^۲، مجید مهسا^۲

*مرتضی هاشم‌زاده^۲، فاطمه آزادگان‌دهکردی^۲، ندا سلیمانی^۳، هدایت‌الله شیرزاد^۲

^۱ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

^۳ بخش پاتولوژی، بیمارستان الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

(دریافت مقاله: ۹۱/۷/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۲۳)

چکیده

زمینه: عفونت هلیکوباترپیلوری با التهاب معده و ارتضاح سلول‌های پاسخ ایمنی به بافت مخاط معده مرتبط می‌باشد. چندین سایتوکاین از این سلول‌های التهابی ترشح می‌شوند که در نتیجه آن التهاب موضعی به وجود آمده، گسترش پیدا کرده و تداوم می‌یابد. عفونت‌های بالینی مختلف ممکن است الگوی بیان سایتوکاینی متفاوتی داشته باشند. گزارش شده که در عفونت هلیکوباترپیلوری سایتوکاین‌های مانند IL-1 بتا، فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF-α)، IL-17، IL-23 و IL-18 با التهاب بافت مخاط معده مرتبط می‌باشند اما جزئیات و ارتباط این سایتوکاین‌ها با الگوهای التهابی مختلف هنوز نامشخص است.

مواد و روش‌ها: میزان mRNA IL-18 با استفاده از real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت، بدین ترتیب که Total RNA از نمونه‌های بیوپسی ۵۶ بیمار مبتلا به عفونت هلیکوباترپیلوری و ۵۰ بیمار که از لحاظ ابتلا به هلیکوباترپیلوری منفی بودند اما التهاب معده داشتند با استفاده از معروف biozol طبق دستور کیت استخراج شد. با استفاده از ۱ میلی‌گرم از RNA استخراج شده cDNA اولیه ساخته شد و در مرحله بعد به منظور سنجش mRNA IL-18 میکروولیتر از Rotor-Gene با استفاده از PCR پروت اخترасی و پرایمرهای اختصاصی PCR شد. همچنین ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه بیان mRNA IL-18 در بیوپسی افراد آلوده به هلیکوباترپیلوری در مقایسه با افراد غیرآلوده به طور معنی داری بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: IL-18 ممکن است در پاسخ التهابی و پیشرفت پاسخ Th1 برعلیه عفونت هلیکوباترپیلوری، و در ایجاد نتایج بالینی مختلف نقش مهمی داشته باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباترپیلوری، گاستریت، mRNA IL-18

*شهرکرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

IL-18 همانند IL-1 β از لحاظ بیولوژیکی به صورت یک پیش‌ساز پروتئینی ۲۴ کیلودالتونی سنتز می‌شود. تبدیل این پروتئین به فرم فعال ۱۸ کیلودالتونی به‌وسیله‌ی آنزیم مبدل IL-1 β (کاسپاز ۱) انجام می‌شود (۹) که این برش برای فعالیت بیولوژیکی IL-18 ضروری است.

IL-18 با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و افزایش پاسخ در دفاع بر علیه پاتوژن‌ها نقش عمدتی بازی می‌کند (۱۰-۱۳).

IL-18 و IL-12 با اثر همسو باعث افزایش سیتوکوکسیستیه سلول‌های NK و تولید INF- γ از این سلول‌ها می‌شوند (۱۴). بسیاری از پاسخ‌های IL-18 مشابه عملکرد بیولوژیکی IL-12 می‌باشد (۱۵). با این وجود نقش کمک محركی آن بهمنظور ازدیاد سلول‌های Th1 و تولید INF- γ توسط این سلول‌ها به فعالیت‌های IL-12 وابسته است (۱۶). دلیل اساسی مبنی بر اینکه عدم تعادل در پاسخ Th1 و Th2 ممکن است منجر به اختلالات مزمن مانند التهاب خودایمن تیروئید و بیماری التهاب روده شود، وجود ندارد (۱۷ و ۱۸). پاسخ ایمنی به هلیکوباکترپیلوری مهم‌ترین فاکتور مؤثر در آسیب بافت موکوس معده می‌باشد (۱۹). عفونت مزمن با هلیکوباکترپیلوری با تولید INF- γ تولید شده به‌وسیله سلول‌های T (۲۰-۲۲) و افزایش موکوسی IL-12 ارتباط داشته و نشان دهنده پاسخ عمدتی Th1 می‌باشد (۲۳-۲۵).

میزان بیان mRNA IL-12 در بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری با فاکتور ویرولانس CagA در مقایسه با افراد آلوده CagA منفی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۳) که در نهایت منجر به تنظیم بیان رسپتورهای IL-18 در سطح سلول‌های Th1 و NK

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی، میکروآئروفیل، خمیده و واجد فلاژل‌های قطبی است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از بافت پوششی انتهایی معده انسان جدا شد (۱).

این باکتری یک بیماری‌زای اختصاصی معده انسان بوده که حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است و حدود ۲ تا ۵ درصد از این افراد نهایتاً به سرطان معده دچار می‌شوند. فراوانی کلی عفونت تا حد زیادی به شرایط اقتصادی و اجتماعی وابسته است. انتقال عفونت اغلب از طریق بلع دهانی باکتری کسب شده و اساساً بین افراد خانواده و در ابتدای کودکی انتقال می‌یابد. تحقیقات صورت گرفته تاکنون نشان‌دهنده ارتباط این باکتری با زخم‌های معده‌ای-روده‌ای و نیز سرطان معده می‌باشد.

در بررسی اطلاعات به دست آمده از سراسر دنیا مشاهده شد که در سال ۲۰۰۲، ۹۳۴۰۰۰ مورد سرطان معده اتفاق افتاده بود و از این تعداد، سالانه ۷۰۰۰۰۰ مورد به مرگ متنه شده بود (۱-۶).

مطالعات انجام گرفته در موش‌های که ژن خاصی از آن‌ها مورد هدف قرار گرفته، نشان می‌دهد که سایتوکاین‌های Th1 باعث پیشرفت گاستریت می‌شود در حالی که سایتوکاین‌های Th2 باعث جلوگیری از التهاب معده می‌شود. این گرایش پاسخ Th1 ممکن است در نتیجه افزایش تولید IL-18 در ناحیه آنتروم معده در پاسخ به عفونت هلیکوباکترپیلوری ایجاد شود (۷).

IL-18 سایتوکاینی است که اخیراً در مواجهه‌ی سلول‌های کبد موش‌های آزمایشگاهی با لیبوپلی‌ساکارید پروپیونی باکتریوم آکنه شناسایی شد. IL-18 از لحاظ ساختار و عملکرد مشابه خانواده IL-1 β می‌باشد (۸).

مولکولی دانشکده پزشکی انتقال داده شد. به کمک کیت استخراج DNA از بافت (Bioflux-Japan) ژنومی بافت معده بیماران استخراج شد و در دمای ۲۵- درجه سانتیگراد تا انجام آزمایشات نگهداری شد. پس از آن حضور یا عدم حضور باکتری در نمونهها با بررسی حضور ژنهای UreA و 16s rRNA به روش PCR ساده به ترتیب با کمک پرایمرهای HP64-f\HP64-r و HP1\HP2 بررسی گردید (۳۰).

می شود (۲۶).

مطالعات اخیر نشان می دهند که IL-18 در بیماری Crohn نقش دارد به طوری که سطح بالایی از پروتئین IL-18 در حالت فعال این بیماری وجود دارد اما در اولسکولیت این حالت مشاهده نمی شود (۲۷ و ۲۸). هدف از انجام این مطالعه مقایسه بیان mRNA IL-18 در بیماران دارای التهاب معده مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری و بیماران دارای التهاب معده اما بدون عفونت هلیکوباکترپیلوری می باشد.

استخراج RNA و تهیه cDNA

استخراج کل RNA با استفاده از محلول Biozol(Bioflux-Japan) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه Nanodrop spectrometer (nanodropspectrometer, USA) تعیین و نسبت جذب نوری (Optical Density) RNA در طول موج های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. از نمونه هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آن ها بین ۱/۸ تا ۲/۲ بود برای استخراج cDNA استفاده گردید. در این مطالعه مقدار ۱ میکروگرم از RNA با استفاده از پرایمر Fermentas Revert) Random Hexamer (AidTM First Strand cDNA synthesis Kit طبق پروتکل شرکت سازنده به cDNA تک رشته ای تبدیل شد. در اینجا دو مرحله انکوباسیون وجود داشت: در ابتدا مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و انکوباسیون دوم ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت. در نهایت، واکنش با ۱۰ دقیقه حرارت در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به پایان رسید. cDNA استخراج شده در ۷۰- درجه سانتیگراد رسید.

مواد و روش ها

نمونه گیری

از ۵۶ بیمار دارای گاستریت مبتلا به هلیکوباکترپیلوری و همچنین ۵۰ بیمار دارای گاستریت که از لحاظ عفونت به هلیکوباکترپیلوری منفی بودند، به روش آندوسکوپی بیوپسی گرفته شد. معیار خروج در این مطالعه بیمارانی بودند که در دو ماه اخیر عوامل ضدترشحی، درمان ضد میکروبی مانند آنتی بیوتیک ها یا بیسموت و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی دریافت کرده اند. نمونه های بیوپسی گرفته شده فوراً در تانک نیتروژن مایع فریز شدند تا در مراحل بعد RNA آنها استخراج شود.

تست اوره آز سریع بر روی بیوپسی گرفته شده از معده انجام شد و نمونه ها از لحاظ تشخیص باکتری و تعیین درجه التهاب بر اساس سیستم سیدنی درجه بندی شدند (۲۹).

تشخیص هلیکوباکترپیلوری در نمونه بافتی علاوه بر رنگ آمیزی گیمسای اصلاح شده به روش PCR انجام شد. به منظور تشخیص هلیکوباکترپیلوری نمونه بیوپسی از بیمار در کوتاه ترین زمان ممکن به منظور انجام تست های مولکولی به مرکز تحقیقات سلوی و

NCBI PERLPRIMER و پایگاه اطلاعاتی طراحی (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) پرایمرها انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

برای مصارف بعدی نگهداری شد.

پرایمرها
در این مطالعه ژن IL-18 به عنوان ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت. سپس توسط نرم افزار GENERUNNER

جدول ۱) توالی پرایمرها و پروب

Forward β-actin	5-AGCCTCGCCTTGCCGA-3
Reverse	5-CTGGTGCCTGGGCG-3
Probe	FAM-CCGCCGCCGTCCACACCCGCC-TAMRA
IL-18 Forward	5-GACCAAGAAATCGGCCTCTA-3
Reverse	5 CCATACCTCTAGGCTGGCTATCTT-3
Probe	FAM-ATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCGGAC-TAMRA

شد. در نهایت اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از برنامه نرم افزار SPSS Inc (SPSS Inc، Chicago، IL، USA) ویرایش ۱۶ با استفاده از آزمون Mann-Whitney U از نظر بیان ژن در دو گروه مختلف بررسی گردید. برای تهیه شکل‌های مربوطه از نرم افزار GraphPad Prism 5 Demo استفاده شد.

یافته‌ها

مشخصات جنسیت بیماران در دو گروه آنوده و غیرآنوده در جدول ۲ ارائه شده که در کل شامل ۴۷ بیمار مرد و ۶۱ بیمار زن می‌باشد. میانگین و انحراف معیار سن بیماران در گروه آنوده $42/2 \pm 20/5$ و در گروه غیر آنوده $39/1 \pm 23/6$ بود.

جدول ۲) محاسبه آماری فراوانی جمعیت مورد مطالعه

کل	جنسیت		
	مرد	زن	
۵۶	۲۳	۳۳	آنوده
۵۰	۲۴	۲۶	غیر آنوده
۱۰۶	۴۷	۵۹	کل

بیان IL-18 mRNA در افراد آنوده هلیکو باکتریپلوری و افراد غیر آنوده آنالیز آماری نشان داد (جدول ۳) که تفاوت معنی داری

واکنش Real-Time PCR(TaqmanProb)

تمام واکنش‌های Real-Time PCR در دستگاه Rotor Gene TM 3000 (Corbett) زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید. مرحله اول ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه که منجر به واسرشتگی (Denaturation) مولکول‌های cDNA می‌شود، مرحله دوم ۴۵ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشتگی، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای جفت شدن (Annealing) و گسترش (Extension) انجام شد. این واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۱ میلی لیتری انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر از TaqMan Universal PCR Master Mix (2X- rotor gene-Germany)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۰/۲ میکرولیتر از پروب‌ها با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۷ میکرولیتر آب DNase free RNase ۰/۲ میکرولیتر cDNA الگو بود. آنگاه نمونه مورد نظر در آنالایزر قرار داده شد و ۴۵ سیکل تکثیر گردید. برای آنالیز داده‌ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β -actin به عنوان ژن رفرانس محاسبه

هليکوباكترپيلوري بيشر است. اين امر نشان مي دهد که هليکوباكترپيلوري در افرايش IL-18 نقش دارد. همچنين ثابت شده است که رونوشت هاي IL-18 در موکوس ايلئوم و روده و همچنين سلول هاي پانکراس، كلية، كبد و انواع ديگري از سلول ها بالا مي روود (۲۷، ۳۴ و ۳۶).

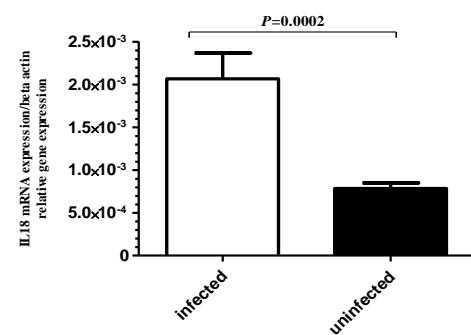
ممکن است نيمه عمر mRNA IL-18 برخلاف بسياري از سایتوکاین ها طولاني باشد (۳۳). در حقيقت ناچие ۳^۱ IL-18 که ترجمه نمي شود قادر توالى AUUUA که يك توالى ناپايدار کننده است، مي باشد. سطح بالاي رونوشت هاي IL-18 در بافت هاي عفوني و غير عفوني بيانگر اين مطلب است که احتمالاً فعاليت بيلوژيکي اين سایتوکاین بعد از ترجمه کنترل مي شود. سطح بالاي رونوشت IL-18 در معده نسبت به IL-12 بالاتر است (۲۳). اما در مطالعه انجام شده، افرايش بيان IL-12 در عفونت با سوش هاي از هليکوباكترپيلوري که داراي فاكتور ويرولانس cagA مي باشند در ارتباط است (۲۳).

IL-18 برای فعال شدن از نظر بيلوژيکي نيازمند فرآيند آنزيمی پس از ترجمه مي باشد (۳۵). تجزيه و تحليل حاصل از بيوپسي نمونه هاي به دست آمده از آنtrap معده وجود ايزوفرم بالغ ۱۸ کيلو دالتونی IL-18 را در موارد مثبت و منفي هليکوباكترپيلوري نشان مي دهد. با اين وجود مطالعات قبلی بر روی موکوس روده در بيماران دارای التهاب رودهی بزرگ بيان IL-18 ۱۸ کيلو دالتونی را نشان مي دهد (۲۷). اما پيش ساز ۲۴ کيلو دالتونی IL-18 در موکوس رودهای افراد سالم نيز يافت شده است (۲۷ و ۳۸). تكنيك هاي کمي مانند الایزا به منظور تشخيص IL-18 نمي تواند بين پيش ساز ۱۸ و IL-18 بالغ افتراق حاصل کند. در بيماری Crohn که در آن ميزان بالاي پروتئين

بين ميزان بيان mRNA IL-18 در افراد دارای گاستريت با عفونت هليکوباكترپيلوري و افراد دارای گاستريت قادر عفونت ($P=0.0002$) وجود دارد (شکل ۱).

جدول ۳) محاسبه آماری بيان IL18 mRNA در افراد آلووده و غيرآلوود

	آلووده	غيرآلوود
P	0.0002	0.17
n	56	50



شکل ۱) بيان IL18 mRNA در بيوپسي بيماران مبتلا و غير مبتلا به هليکوباكترپيلوري

بحث

IL-18 یک سایتوکاین تنظیم کننده سیستم ایمنی با اثر چندگانه است که در بیماری های اتوایمیون و بیماری های عفونی به ترتیب مانند Crohn، آرتربیت روماتوئید و توبرکولوئید لپرماتوز در بدن انسان افزایش می باید (۲۷، ۲۸، ۳۱ و ۳۲).

در این مطالعه سطح رونوشت IL-18 در بيوپسي بيماران دارای التهاب معده مبتلا به عفونت هليکوباكترپيلوري و بيماران دارای التهاب معده اما بدون عفونت هليکوباكترپيلوري تعیین و مشخص شد که بيان سطح mRNA در بيماران مبتلا به عفونت

می‌تواند پاسخ ویژه سلول‌های T را به هلیکوباترپیلوری ایجاد کنند، را تحت تأثیر قرار دهد (۴۱-۴۹). بعلاوه IL-18 مستقیماً تولید سایتوکاین‌های IL-1, IL-6 و TNF- α از ماکروفازهایی که قابلیت افزایش گاستریت و کاهش تعداد باکتری را دارد، تقویت می‌کند (۴۲). نقش عملکردی IL-18 در ایجاد التهاب معده و ارتباط سلول‌های مختلف در تولید IL-18 و ارتباط این سایتوکاین با فاکتورهای ویرونانس باکتری نیازمند تحقیقات بیشتر است.

نتیجه‌گیری

IL-18 ممکن است در پاسخهای التهابی معده و افزایش پاسخ Th1 به کلونیزه شدن هلیکوباترپیلوری در معده نقش مهمی ایفا کند. همچنین این ایترلوکین ممکن است نتیجه بیماری‌های مرتبط با عفونت هلیکوباترپیلوری را که در بافت التهابی معده ایجاد می‌شوند تحت تأثیر قرار دهد.

سپاس و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مؤلف اول با شماره ۱۴۶ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی به انجام رسید، که بدین‌وسیله نویسندهای مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت و مرکز تحقیقاتی اعلام می‌نمایند.

References:

- Hatakeyama M. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol 2009; 44: 239-48.
- Delport W, Cunningham M, Olivier B, et al. A population genetics pedigree perspective on

IL-18 با استفاده از وسترن بلاط به اثبات رسیده، ارزیابی پروتئین کامل IL-18 در نمونه‌های بیوپسی بهروش الایزا کاهش IL-18 را نشان می‌دهد (۲۷ و ۲۸). از سوی دیگر سایتوکاین‌های تنظیمی و پیش‌التهابی سیستم ایمنی که بهوسیله هلیکوباترپیلوری تحریک می‌شوند ممکن است پاسخ طبیعی موضعی سلول‌های T را تحت تأثیر قرار دهد. از آنجایی که مشخص شده بیان IFN- γ برخلاف IL-5 و IL-4 در گاستریت ناشی از هلیکوباترپیلوری افزایش پیدا می‌کند، پاسخ Th موضعی در عفونت هلیکوباترپیلوری به طور معمول Th1 در نظر گرفته می‌شود (۳۶). در این مطالعه افزایش بیان IL-18 در نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به گاستریت آلوده به هلیکوباترپیلوری مشاهده شد. در دیگر مطالعات گزارش شده که سطح سرمی IL-18 به طور معناداری در بیماران مبتلا به کارسینومای معده که با عفونت هلیکوباترپیلوری ارتباط داشتند افزایش یافته است (۳۷). به نظر می‌رسد که IL-18 برای تولید ویژه IFN- γ ضروری می‌باشد زیرا در موش‌هایی که از لحاظ IL-18 غیرفعال شده بودند سطح کاهش پیدا کرد. در صورتی که بیان بالای IL-18 در موش‌های ترانس ژن که موجب سطح بالای IFN- γ شد به طور واضح نشان می‌دهد که رابطه‌ی قوی بین IL-18 و توانایی آن در تولید IFN- γ وجود دارد (۳۸). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که IFN- γ می‌تواند بیان موضعی سایتوکاین‌ها، رسپتورهای کموکاین/سایتوکاین، بیان MHC کلاس II مولکول‌های غشایی و کمک تنظیم کننده را که

the transmission of Helicobacter pylori. Genetics 2006; 174: 2107-18.

- Bagheri N, Rahimian G, Salimzadeh L, Azadegan F, Rafieian-Kopaei M, Taghikhani A, Shirzad H: Association of the virulence factors of

- Helicobacter pylori and gastric mucosal interleukin-17/23 mRNA expression in dyspeptic patients. *Excli Journal*. 12 (2013) 5-14.
- 4.Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, et al. Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF- β 1 mRNA expression in gastritis patients. *Microb Pathog* 2014; 67-68: 1-7.
- 5.Pakbaz Z, Shirazi MH, Pourmand MR, et al. Evaluation of Rapid Urease Test Compared with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Helicobacter pylori. *ISMJ* 2014; 16: 394-400.
- 6.Farshad S, Alborzi A, Malek Hossaini A, et al. Identification of Helicobacter pylori DNA in gallstones using Multiplex PCR. *ISMJ* 2006; 8: 103-9.
- 7.Tomita T, Jackson AM, Hida N, et al. Expression of Interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in Helicobacter pylori infection. *J Infect Dis* 2001; 183: 620-7.
- 8.Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 1995; 63: 3966-72.
- 9.Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al. Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. *Nature* 1997; 386: 619-23.
- 10.Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; 9: 143-50.
- 11.Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998; 8: 383-90.
- 12.Kappes MA. Immunomodulatory effects of porcine interleukin-18 on a modified live vaccine immune response against swine influenza virus [dissertation]. Ames: Iowa State Univ., 2009
- 13.Bagheri N, Taghikhani A, Rahimian G, et al. Association between virulence factors of helicobacter pylori and gastric mucosal interleukin-18 mRNA expression in dyspeptic patients. *Microb Pathog* 2013; 65: 7-13.
- 14.Bouzgarrou N, Hassen E, Schvoerer E, et al. Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection. *J medi virol* 2008; 80: 607-14.
- 15.Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11-24.
- 16.Xu Q, Tin SK, Paramalingam SP, et al. Interleukin-18 promoter gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: association with CC genotype at position-607. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 91-5
- 17.Matsuura E, Kang Y, Kitakawa H, et al. Modulation of T cell function by alpha-fetoprotein: an in vivo study on porcine thyroid peroxidase-induced experimental autoimmune thyroiditis in transgenic mice producing human alpha-fetoprotein. *Tumor Biol* 1999; 20: 162-71.
- 18.Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, et al. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am j pathol* 1997; 150: 823-32.
- 19.Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD, et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with Helicobacter pylori: effect of bacterial eradication. *Helicobacter* 2002; 7: 342-8.
- 20.Luzza F, Parrello T, Sebkova L, et al. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of Helicobacter pylori infected children. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 14-20.
- 21.Bamford KB, Fan X, Crowe SE, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-92.
- 22.D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, et al. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 1997; 158: 962-7.
- 23.Hida N, Shimoyama T Jr, Neville P, et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in Helicobacter pylori infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *J clin pathol* 1999; 52: 658-64.
- 24.Bagheri N, Salimzadeh L, Azadegan-Dehkordi F, et al. Expression levels of mRNA cytokines of IL-17 and IL-23 in epithelial/fiber of stomach inpatients with Helicobacter pylori using Real-Time PCR in Chahar Mahal and Bakhtiari province. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 15: 124-31.

- 25.Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, et al. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with Helicobacter pylori. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 316-23.
- 26.Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J clin invest* 2012; 122: 1271-82.
- 27.Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-7.
- 28.Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162: 6829-35.
- 29.Sugimoto M, Wu JY, Abudayyeh S, et al. Unreliability of results of PCR detection of Helicobacter pylori in clinical or environmental samples. *J clin microbiol* 2009; 47: 738-42.
- 30.Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals. *J clin microbiol* 1991; 29: 2543-9.
- 31.Paramalingam SS, Thumboo J, Vasoo S, et al. In vivo pro-and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 96-9.
- 32.García VE, Uyemura K, Sieling PA, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol* 1999; 162: 6114-21.
- 33.Tone M, Thompson S, Tone Y, et al. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* 1997; 159: 6156-63.
- 34.Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156: 4274-9.
- 35.Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J clin immunol* 1999; 19: 1-11.
- 36.Karttunen R, Karttunen T, Ekre H, et al. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in Helicobacter pylori positive and negative gastritis. *Gut* 1995; 36: 341-5.
- 37.Kawabata T, Ichikura T, Majima T, et al. Preoperative serum interleukin-18 level as a postoperative prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2050-5.
- 38.Akhiani AA, Schön K, Lycke N. Vaccine-induced immunity against Helicobacter pylori infection is impaired in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 2004; 173: 3348-56.
- 39.Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* 1997; 158: 1541-50.
- 40.Engstrand L, Scheynius A, Pahlson C, et al. Association of Campylobacter pylori with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. *Infect immun* 1989; 57: 827-32.
- 41.Ye G, Barrera C, Fan X, et al. Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during Helicobacter pylori infection. *J Clin Invest* 1997; 99: 1628-36.
- 42.Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, et al. Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 711-21.

Orjinal Article

Expression of IL-18 cytokine mRNA in gastric mucosa tissue of patients with *H. pylori* infection in Chahar Mahal and Bakhtiari

N. Bagheri¹, Gh. Rahimian², L. Salimzadeh², A. Taghikhani², M. Mahsa², M. Hashemzadeh², F. Azadegan-Dehkordi², N. Solimani³, H. Shirzad^{2*}

¹Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

²Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN

³Department of pathology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, IRAN

(Received 21 Oct, 2012 Accepted 13 Dec, 2012)

Abstract

Background: *H. pylori* infection is associated with gastritis and marked infiltration of the gastric mucosa by inflammatory cells secreting of several cytokines that contribute to maintain and expand the local inflammation. Different clinical expressions of the infection may reflect different patterns of cytokine expression. Interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-17, IL-23, and IL-18 have been reported to be involved in *H. pylori*-induced gastric mucosal inflammation, but the details and relation to different patterns of inflammation remain unclear.

Materials and Methods: Analysis of IL-18 RNA transcripts was performed by real-time PCR. Total RNA was extracted from gastric biopsies of 56 *H. pylori*-infected patients, 50 *H. pylori*-negative patients with gastritis, by biozol reagent according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 mg of total RNA using First Strand cDNA Synthesis Kit (fermentas) and 3 μ L cDNA was amplified by PCR using the 2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (QIAGEN) and specific primers for each cytokine and β -actin.

Results: IL-18 mRNA expression was significantly increased in biopsies of *H. pylori*-infected patients compared to *H. pylori*-uninfected individuals.

Conclusion: IL-18 may play an important role in the inflammatory response and promoting gastric Th1 responses to *H. pylori* colonization, and may ultimately influence the outcome of *H. pylori*-associated diseases that arise within the context of gastritis.

Key Words: Helicobacter pylori, gastritis, IL-18, mRNA

*Address for correspondence: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN; Email:shirzad1951@yahoo.com