

Original Article

Effects of hepatitis C virus NS3 protein on expression of heat shock protein 70 and Glypican3 as the markers of hepatocellular carcinoma

Sepideh Saeb¹, Farzaneh Sabahi^{1*}, Zohreh Mazaheri², Mehrdad Ravanshad^{1*}

ABSTRACT

Background and Aims: Hepatitis C virus (HCV) infection is an important risk factor for the development of liver cancer. The HCV NS3 protein plays a key role in the virus life cycle and can affect normal cellular activities, such as cell proliferation, cell death, and cell signaling pathways. Moreover, it may influence malignancy development. Two cellular genes, heat shock protein 70 (HSP70) and Glypican3 (GPC3), that are assessed in this study, play important roles in the regulation of the cell signaling pathways, including cell proliferation. This study aimed to evaluate the effects of HCV NS3 protein on the expressions of these two genes in the Balb/C mouse model.

Materials and Methods: This study was performed on three groups of male mice of Balb/C (n=8). The first group received NS3 plasmid, the second group received hepatitis B virus HBx plasmid, and the negative control group received distilled water. Two injections were administered via the tail vein, and after the last injection, RNA was extracted from the liver tissue. Next, the cDNA synthesis and real-time polymerase chain reaction for relevant genes were performed.

Results: Findings revealed that the relative expression of the selected genes in the NS3 group was significant in comparison with the negative control group (P=0.0229 for GPC3 and 0.0020 for HSP70). However, there was no significant difference between the NS3 group and the HBx group (P=0.4516 for GPC3 and 0.6740 for HSP70).

Conclusion: Results showed that NS3 protein may affect the increasing expression of the mentioned genes. Nevertheless, for more precise understanding, much more studies should be performed, such as evaluation of the effect of NS3 on other involved proteins in cell signaling pathways, studying other domains of NS3, performance of pathological and histological tests, usage of various experimental methods, assessment of the role of NS4A as a cofactor for NS3, and usage of vectors with more stability.

Keywords: Glypican3, Hepatitis C virus, Hepatocellular carcinoma, HSP70, NS3



Citation: Saeb S, Sabahi F, Mazaheri Z, Ravanshad M. [Effects of hepatitis C virus NS3 protein on expression of heat shock protein 70 and Glypican3 as the markers of hepatocellular carcinoma]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(4): 356-364. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.4.104>

Received: May 10, 2021

Accepted: October 10, 2021

¹ Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Basic Medical Sciences Research Center, Histogenotech Co, Tehran, Iran

***Corresponding author:**

1. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: Ravanshad@modares.ac.ir

Tel: +9821-82883836

2. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: sabahi_f@modares.ac.ir

Tel: +9821-82883836

اثر پروتئین NS3 ویروس هپاتیت سی بر القای بیان نشانگرهای HSP70 و Glypican3 کارسینومای هپاتوسلولار

سپیده صائب^۱ ID، فرزانه صباحی^۱ ID*، زهره مظاهری^۲ ID، مهرداد روانشاد^۱ ID*

چکیده

زمینه و هدف: عفونت ویروس هپاتیت C (HCV) یک عامل خطر مهم در ایجاد سرطان کبد است. پروتئین غیرساختاری ۳ (NS3) ویروس HCV که نقشی کلیدی در چرخه زندگی ویروس ایفا می‌کند، می‌تواند بر فعالیت‌های طبیعی سلولی مانند: تکثیر سلول، مرگ سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تأثیر بگذارد همچنین شاید بتواند در ایجاد بدخیمی مؤثر باشد. از سوی دیگر دو ژن سلولی Heat Shock Protein 70 (HSP70) و Glypican3 (GPC3) که در این مطالعه ارزیابی می‌شوند، نقش‌های مهمی در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی از جمله تکثیر سلولی دارند. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر پروتئین NS3 HCV بر بیان این دو ژن در مدل موش Balb / C بود.

روش تحقیق: در این مطالعه، سه گروه موش نر Balb / C (n=8) در نظر گرفته شد: گروه اول که پلاسمید NS3 را دریافت کردند، گروه دوم که پلاسمید HBx ویروس هپاتیت B را دریافت کردند و گروه کنترل منفی که آب مقطر دریافت نمودند. دو تزریق از طریق ورید دم انجام شد و پس از آخرین تزریق، RNA از بافت کبد استخراج شد، سپس سنتز cDNA و Real Time PCR برای ژن‌های مربوطه صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن‌های انتخاب شده در گروه NS3 در مقایسه با گروه کنترل منفی معنی‌دار بود. (برای ژن GPC3، $P=0.029$ و برای ژن HSP70، $P=0.020$) اما تفاوت معنی‌داری بین گروه NS3 در مقایسه با گروه HBx وجود نداشت (برای ژن GPC3، $P=0.456$ و برای ژن HSP70، $P=0.674$).

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد که NS3 شاید بر افزایش بیان ژن‌های ذکر شده مؤثر باشد؛ اما برای فهم دقیق‌تر، مطالعات بسیار بیشتری باید انجام شود؛ مانند: ارزیابی تأثیر NS3 بر سایر پروتئین‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، مطالعه سایر دومین‌های NS3، انجام آزمایش‌های پاتولوژیک و بافت‌شناسی، تغییر روش‌های آزمایش، ارزیابی نقش NS4A به عنوان یک فاکتور برای NS3 و استفاده از وکتورهایی با پایداری بیشتر.

واژه‌های کلیدی: Glypican3، ویروس هپاتیت سی، کارسینومای هپاتوسلولار، HSP70، NS3

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۴): ۳۵۶-۳۶۴.

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

^۱ گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات علوم پایه پزشکی، شرکت فن‌آوران بافت و ژن، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** ۱. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس: تهران - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۲۸۳۶ پست الکترونیکی: Ravanshad@modares.ac.ir

۲. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس: تهران - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۲۸۳۶ پست الکترونیکی: Ravanshad@modares.ac.ir

مقدمه

ویروس هپاتیت C (HCV) یک ویروس پوشش‌دار دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای با پلاریته مثبت می‌باشد که به خانواده Flaviviridae تعلق دارد. عفونت HCV در جمعیت زیادی از بیماران مزمن مشاهده می‌شود و می‌تواند منجر به سیروز و هپاتوسلولار کارسینوما (HCC^۱) شود (۱). ژنوم ویروس تقریباً ۹/۶ کیلو باز است که یک پیش‌ساز پروتئین (تقریباً ۳۰۱۰ اسید آمینه) را کد می‌کند که توسط پروتئازهای میزبانی و ویروسی به پروتئین‌های ساختاری core, E1, E2 و غیر ساختاری NS1(P7), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A و NS5B پردازش می‌شود (۲). NS3^۲ یک پروتئین ویروسی چند منظوره با ۶۳۱ اسید آمینه است (۳) و می‌تواند با پروتئین‌های کنترل کننده چرخه سلولی و آپوپتوز واکنش دهد. نقش مؤثر پروتئین NS3 به عنوان یک عامل خطر برای پیشرفت سیروز و HCC مورد تأکید قرار گرفته است (۴). HCC یک فرآیند پیچیده چند مرحله‌ای است که شامل فعال شدن انکوژن‌ها، غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر تومور و تغییر در مسیرهای سیگنالینگ سلول است. این مسیرها شامل Hedgehog, Notch, WNT/ β -Catenin, p53, pRb, TGF- β و غیره است (۵-۷). تعداد زیادی نشانگر بافتی و سرمی با تهاجم، متاستاز، عود و اهمیت تشخیصی HCC مرتبط هستند، مانند HSP70^۳ و GPC3^۴ (۸). GPC3 یک نشانگر بافت شناسی و سرولوژیکی است و بیان آن در HCC تا حدی اختصاصی است (۹). انکوژنیسته با واسطه GPC3 با تأثیرگذاری بر مسیر سیگنالینگ مانند IGF^۵ است. همچنین مطالعه اثرات بیان GPC3 در رده‌های سلولی HCC نشان داده است که این پروتئین با تحریک مسیر سیگنالینگ Canonical / Wnt باعث تحریک ایجاد سرطان کبد می‌شود (۱۰).

HSP70 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های شوک گرمایی است که در بیان آن در پاسخ به استرس فیزیولوژیک و پاتولوژیک از

جمله تغییرات انکوژنز القا می‌شود (۱۱). HSP70 ممکن است در فرآیند سرطان‌زایی شرکت کند و از طریق تنظیم مسیرهای آپوپتوتیک، تکثیر و بقای سلول‌های توموری را تغییر دهد. بیان HSP70 در بدخیمی‌های مختلف در انسان افزایش می‌یابد. یافته‌ها نشان می‌دهد که بیان آن در HCC بسیار افزایش می‌یابد (۱۲). HSP70 می‌تواند نقش مهمی در پاتوژنز HCC مربوط به HCV داشته باشد (۱۲، ۱۱).

پروتئین HBx یک پروتئین تحریک کننده رونویسی^۶ است که توسط ویروس هپاتیت B (HBV) کد می‌شود و می‌تواند در سرطان کبد نقش داشته باشد. HBx با اهداف مختلف میزبانی و با بسیاری از عملکردهای سلولی، از جمله تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز، سیگنالینگ، تنظیم رونویسی، مولکول‌های چسبنده سلول، ژن‌های سرکوب کننده تومور و انکوژن‌ها واکنش می‌دهد (۱۳). مطابق با مقالات، HBx می‌تواند بیان HSP70 و GPC3 را افزایش دهد (۱۷-۱۳).

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر حضور پروتئین NS3 بر تغییر بیان دو ژن HSP70 و Glypican3 در حیوان آزمایشگاهی به منظور تعیین اثر NS3 بر روی این دو ژن درگیر در برخی از مسیرهای سیگنالینگ بود. از پلاسمید HBx برای مقایسه نتایج با گروه NS3 استفاده شد.

روش تحقیق

سازه‌های پلاسمیدی

پلاسمید NS3

پلاسمید اصلی (gWiz) که بیان کننده پروتئین NS3 کامل با فعالیت پروتئازی است، به صورت هدیه از دکتر Gloria Gonzalez-Aseguinolaza (مرکز تحقیقات CIMA، ناوارا، اسپانیا) دریافت شد (تصویر ۱). بیان پروتئین NS3 تحت کنترل پروموتور Cytomegalovirus (CMV) است و تأیید توالی و بیان آن قبلاً انجام شده است (۱۸).

¹ Hepatocellular carcinoma

² Non structural protein 3

³ Heat shock protein 70

⁴ Glypican3

⁵ Insulin like growth factor

⁶ Transactivator of transcription protein HBx

مدل حیوانی

موش‌های نر c / Balb (۶-۸ هفته‌ای) از انستیتوی پاستور ایران (کرج، ایران) خریداری شده و به سه گروه ۸ تایی تقسیم شدند. تمام آزمایشات بر اساس قوانین مربوط به مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مصوب مورخه ۹۲/۱۱/۱۹ با شماره نامه ۶۵۷۷ انجام شده است.

استخراج و تزریق پلاسمیدها

پس از استخراج پلاسمیدها از باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید NucleoBond® Xtra Midi kit شرکت MN آلمان، مرحله تزریق پلاسمیدها انجام شد. پس از ضد عفونی کردن دم با الکل، با استفاده از سرنگ انسولین، حداکثر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۲۵ میکروگرم در میکرولیتر به ورید دمی تزریق شد. تزریق دوم با همین کیفیت ۷ روز بعد انجام شد. دو گروه موش یکی پلاسمید NS3 و دیگری پلاسمید HBx را دریافت کردند. گروه سوم نیز به عنوان کنترل منفی، آب مقطر دریافت نمودند. ۶ روز بعد موش‌ها کشته شده، بافت کبد خارج شده و بلافاصله در یک میلی‌لیتر محلول تریزول در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و انجام Real Time PCR

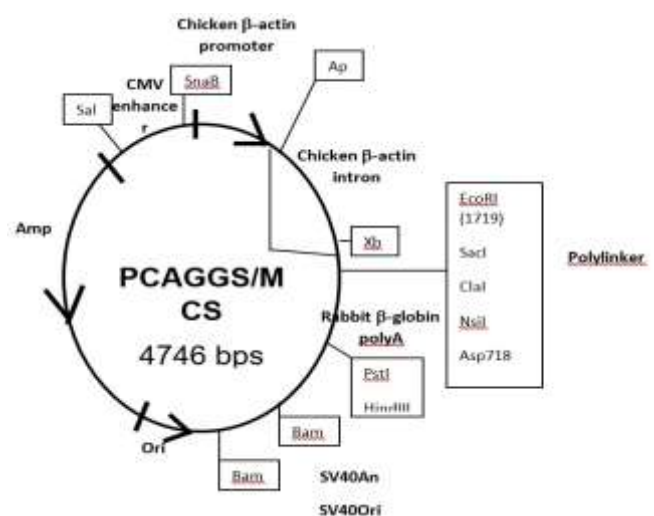
RNA تام بافت کبدی با استفاده از محلول Trizole (Qiagen، آلمان) طبق دستورالعمل مربوطه استخراج شد و بعد سنتز cDNA با استفاده از کیت Thermo Scientific RevertAid شرکت فرمتاز انجام گرفت. سپس، cDNA ها برای انجام Real-Time PCR استفاده شدند. جهت انجام این کار برای هر بار تست، مواد زیر به نسبت‌های گفته شده در داخل ظروف ۴۸ خانه ریخته و با یکدیگر ترکیب شدند. این مواد شامل: CYBER Green Master Mix (ABI, USA) به میزان ۱۰ پیکومولار (۰/۵ میکرولیتر)، Forward primer به میزان ۱۰ پیکومولار (۰/۵ میکرولیتر)، Reverse primer به میزان ۱۰ پیکومولار (۰/۵ میکرولیتر)،



تصویر ۱- نقشه ژنتیکی پلاسمید gwiz حاوی ژن NS3

پلاسمید HBx

این پلاسمید (PCAGGS / MCS) که HBx را بیان می‌کند، به صورت هدیه از دکتر Gloria Gonzalez-Aseguinolaza (مرکز تحقیقات CIMA، ناوارا، اسپانیا) دریافت شد. بیان پروتئین HBx تحت کنترل پرموتر chicken β actin است (تصویر ۲).



تصویر ۲- نقشه ژنتیکی پلاسمید PCAGGS / MCS حاوی ژن HBx

میکرولیتر)، cDNA به میزان ۱ میکرولیتر و DEPC Water به میزان ۸ میکرولیتر می باشند.

هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴

درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نسبت بیان ژن های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه ای چرخه آستانه و مقادیر Cq مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده ها در فرمول $\Delta\Delta Cq$ میزان بیان ژن های هدف با ژن مرجع GAPDH نرمال سازی شد. اطلاعات مربوط به پرایمرهای استفاده شده برای GPC3، HSP70 و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- ویژگی های پرایمرهای استفاده شده

نام ژن	توالی پرایمرها	طول محصول	کد ژن در NCBI	دمای Tm
GPC3	FOR: 5'-GGAGAGATACAGCCAGAAGGC-3' REV: 5'-AGGTGGTGATCTCGTTGTCC-3'	۳۶۸	NM_016697	۶۰
HSP	FOR: 5'-CGAGAGCCGGTCGTTCTTC-3' REV: 5'-CAGGTACGCTCAGCGATCT-3'	۷۹	NM_010479	۶۰
GAPDH	FOR: 5'-TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC-3' REV: 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'	۱۷۸	NM_001289726	۶۰

تحلیل آماری

همان گونه که قبلاً بیان شد، هر گروه شامل ۸ نمونه بود و داده ها حاصل $\text{mean} \pm \text{SD}$ هستند. تحلیل آماری داده ها در نرم افزار Graphpad prism 9.0.0 و با آزمون Unpaired t test with Welch's correction انجام شد و جهت بررسی معنی داری، مقدار P value در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. نمودارهای مربوطه نیز با نرم افزار Graphpad prism 9.0.0 رسم شدند.

یافته ها

نتایج به دست آمده از مقایسه بیان ژن ها در گروه های مختلف:

۱. نمودار ۱، میزان (نسبت) بیان دو ژن GPC3 و HSP70 را نشان می دهد؛ همان طور که پیش از این گفته شد، بیان این ژن ها با ژن مرجع GAPDH نرمال سازی شده است. گروه NS3 و HBx به عنوان گروه های تیمار شده و گروه کنترل منفی به عنوان

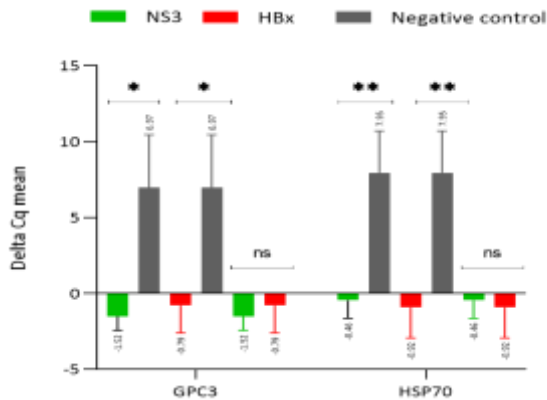
گروه تیمار نشده در نظر گرفته شده اند و بر این اساس با استفاده از قرار دادن داده ها در فرمول $\Delta\Delta Cq$ میزان (نسبت) بیان ژن های هدف نسبت به گروه کنترل منفی محاسبه شد.

مطابق نمودار ۱، بیان ژن GPC3 در گروه دریافت کننده پلاسמיד NS3، نسبت به گروه کنترل منفی، ۸/۴۹ برابر است؛ همچنین این میزان در گروه دریافت کننده پلاسמיד HBx نسبت به گروه کنترل منفی نیز افزایش دارد (۷/۷۷ برابر).

۲. طبق نمودار ۱، بیان دیگر ژن مورد مطالعه یعنی ژن HSP70 در گروه دریافت کننده پلاسמיד NS3، نسبت به گروه کنترل منفی، ۸/۴۱ برابر است. این افزایش بیان در گروه دریافت کننده پلاسמיד HBx هم دیده می شود و نسبت به گروه دریافت کننده پلاسמיד NS3 نیز بیشتر می باشد (۸/۸۸ برابر).

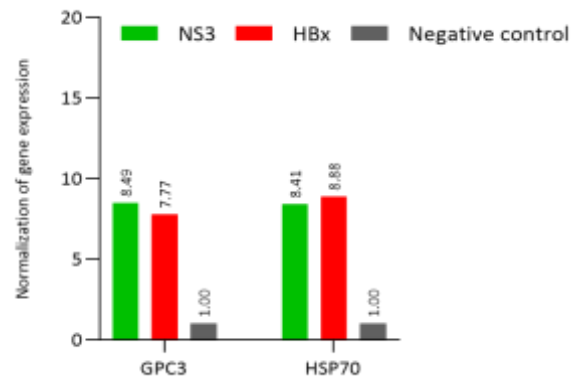
۳. افزایش بیان هر دو ژن در گروه دریافت کننده پلاسמיד HBx، با یافته های مطالعات پیشین در خصوص تأثیر مثبت HBx در افزایش بیان این دو ژن مطابقت دارد.

گروه دریافت کننده NS3 و HBx نیز با هم مقایسه شده است. مقایسه مقادیر ΔCq ژن GPC3 در دو گروه دریافت کننده پلاسمید NS3 و HBx تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. همین نتیجه گیری درباره HSP70 نیز صادق است. در جدول ۲، مقادیر P در گروه های مختلف آمده است.



۴. در نمودار ۲، مقادیر ΔCq ($Cq(target)-Cq(reference)$) دو ژن GPC3 و HSP70 در گروه NS3 در مقایسه با کنترل منفی و HBx در مقایسه با کنترل منفی آورده شده است. همان طور که پیش تر ذکر شد، تفاوت معنی دار و افزایش بیان ژن ها در دو گروه NS3 و HBx در اینجا نیز مشهود است.

۵. در نمودار ۲، مقادیر ΔCq دو ژن GPC3 و HSP70 در دو



نمودار ۲- مقایسه مقادیر ΔCq در هر گروه NS3 و HBx نسبت به گروه کنترل منفی.

P>0.05: ns P<0.05: * P<0.01: **

نمودار ۱- نسبت بیان ژن ها در دو گروه NS3 و HBx.

جدول ۲- نسبت بیان ژن ها در گروه های مختلف

مقادیر P			
نام ژن	گروه NS3 در مقایسه با گروه کنترل منفی	گروه HBx در مقایسه با گروه کنترل منفی	گروه NS3 در مقایسه با گروه HBx
GPC3	۰/۰۲۲۹	۰/۰۱۲۶	۰/۴۵۱۶
HSP70	۰/۰۰۲۰	۰/۰۰۲۲	۰/۶۷۴۰

(۱۹). در یک مطالعه نشان داده شد که ویروس قادر به القای سلول های بنیادی سرطانی در کشت سلول و تومورهای زئوگرافت موشی است (۲۰).

در مطالعات مختلف، پروتئین NS3 ویروس به عنوان یک عامل مؤثر در تغییرات مسیرهای پیام رسانی و مولکول های مختلف سلولی مورد توجه واقع شده است. اولین اثبات آزمایشگاهی تومورزا بودن NS3 توسط Sakamuro و همکاران در رده سلولی غیر توموری فیروبلاست موشی (NIH 3T3) انجام شد (۴). دو ژن

بحث

عفونت مزمن با ویروس هپاتیت C یک مشکل بهداشت جهانی است که به طور متوسط ۱۵۰ میلیون نفر را در جهان گرفتار کرده است. HCV خطر ابتلا به سرطان کبد را با تحریک التهاب و فیروز کبد آلوده افزایش می دهد و شواهد اپیدمیولوژیک هم ارتباط نزدیک و واضحی را بین عفونت HCV و سرطان کبد نشان می دهند. تغییرات مولکولی القاء شده بر اثر HCV در سلول های آلوده، به شکل معناداری در گسترش و پیشرفت سرطان کبد، دخالت دارند

انتخاب شده در این تحقیق، از نشانگرهای هپاتوسلولار کارسینوما محسوب می‌شوند. ژن GPC3، علاوه بر تحریک مسیر WNT/ β -Catenin قادر است مسیر پیام‌رسانی IGF را با روشی اختصاصی فعال کند. این پروتئین می‌تواند سرطان‌زایی را از طریق واکنش بین IGF-II و گیرنده آن، تحریک کند که این یافته‌ها در فهم نقش GPC3 در سرطان کبد مهم هستند (۲۱). هم‌چنین NS3 قادر است مسیر پیام‌رسانی Notch را با اتصال به یک فاکتور رونویسی فعال کند (۲۲). پروتئین NS3 به عنوان یک نشانگر بافت‌شناسی و سرولوژی کشف شد که بیان آن برای هپاتوسلولار کارسینوما اختصاصی است (۹). دیگر ژن مورد بررسی، یعنی HSP 70 که یکی از نشانگرهای زودرس سرطان کبد به حساب می‌آید و در ارتباط با ایجاد سرطان کبد مرتبط با HCV می‌باشد. کمپلکس این پروتئین و HSP 40 با پروتئین NS5A ویروس در تولید ذرات ویروسی جدید نقش دارد (۲۳).

نویسندگان هدف از مطالعه حاضر را ارزیابی اثر پروتئین NS3 بر تغییر بیان دو ژن HSP70 و Glypican3 در حیوان آزمایشگاهی عنوان کرده‌اند. از نظر داور محترم لازم بود نویسندگان پس از تزریق دوز دوم پلاسמיד به حیوان آزمایشگاهی، میزان بیان پروتئین NS3 را در بافت کبد گروه‌های مختلف مورد سنجش قرار می‌دادند؛ اما این کار انجام نشده است. بنابراین نتیجه‌گیری عنوان شده از سوی نویسندگان در حد فرضیه باقی مانده و نمی‌توان تغییرات بیان ژن را به پروتئین NS3 نسبت داد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، در گروه دریافت‌کننده پلاسמיד NS3 میزان بیان هر دو ژن GPC3 و HSP 70 نسبت به گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری افزایش یافته است. شاید بتوان گفت پروتئین NS3، توانسته نقش تحریک‌کنندگی برای بیان این ژن‌ها داشته باشد؛ اما این افزایش در مقایسه با گروه دریافت‌کننده پلاسמיד HBx که به نحوی گروه کنترل مثبت به شمار می‌آیند، تفاوت معنی‌داری ندارد. ذکر این نکته نیز ضروری به نظر می‌رسد که ما بیان ژن‌های

انتخاب شده را در سطح mRNA بررسی کردیم و تحقیقات تکمیلی، از جمله مطالعات آسیب‌شناسی و بافت‌شناسی بر روی بافت کبد (مانند مطالعات ایمونوهیستوشیمی) و مطالعه در سطح بیان پروتئین، به منظور درک بهتر و دقیق‌تر می‌تواند مفید باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده درباره نقش پروتئین NS3 در این پژوهش و تحقیقات قبلی و لزوم بررسی‌های بیشتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در سرطان کبد بر اثر HCV، به نظر می‌رسد بررسی اثر NS3 بر سایر پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی مختلف به ویژه پروتئین‌های ابتدایی هر مسیر، هم در کشت سلول و هم در مدل‌های حیوانی، می‌تواند به درک مکانیسم‌های ایجاد سرطان کبد و درمان آن کمک کند.

به منظور دست‌یابی به نتایج دقیق‌تر و بررسی بهتر صحت نتایج این تحقیق، تغییر در زمان خارج کردن کبد، تعداد دفعات تزریق، فواصل، غلظت و حجم تزریقات و بررسی‌های بیشتر در شرایط کنترل شده سلولی و بالینی ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین استفاده از وکتورهایی با قابلیت بیان طولانی‌تر و پایداری بیشتر در بدن موجود زنده، باعث افزایش دقت و بهبود صحت نتایج فوق خواهد شد. نکته دیگری که بیان آن مفید به نظر می‌رسد این است که نقش کوفاکتوری پروتئین NS4A برای عملکرد NS3 بسیار مهم است. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی این مسئله لحاظ شود و از وکتوری که هر دو پروتئین را در بر دارد، استفاده شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ایران داک ۲۲۱۰۷۴۹ در گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

- 1- Heim MH. Innate immunity and HCV. *J Hepatol*. 2013; 58(3): 564-74 DOI: [10.1016/j.jhep.2012.10.005](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.005)
- 2- Hiscott J, Lacoste J, Lin R. Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11): 1477-84. DOI: [10.1016/j.bcp.2006.06.030](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.030)
- 3- He Q-Q, Cheng R-X, Sun Y, Feng D-Y, Chen Z-C, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(3): 474-8. DOI: [10.3748/wjg.v9.i3.474](https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i3.474)
- 4- Kasprzak A, Adamek A. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepatol Res*. 2008; 38(1): 1-26. DOI: [10.1111/j.1872-034X.2007.00261.x](https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00261.x)
- 5- Jeong SW, Jang JY, Chung RT. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol*. 2012; 18(4): 347-56. DOI: [10.3350/cmh.2012.18.4.347](https://doi.org/10.3350/cmh.2012.18.4.347)
- 6- Mikhail S, He AR. Liver Cancer Stem Cells. *Int J Hepatol*. 2011; 2011: 486954. DOI: [10.4061/2011/486954](https://doi.org/10.4061/2011/486954)
- 7- Wang B, Jacob ST. Role of cancer stem cells in hepatocarcinogenesis. *Genome Med*. 2011; 3(2): 1-6. DOI: [10.1186/gm225](https://doi.org/10.1186/gm225)
- 8- Singhal A, Jayaraman M, Dhanasekaran DN, Kohli V. Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma: Predictive tools for prognosis and recurrence. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 82(2): 116-40. DOI: [10.1016/j.critrevonc.2011.05.005](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.05.005)
- 9- Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol*. 2009; 34(3): 649-56. DOI: [10.3892/ijo_00000190](https://doi.org/10.3892/ijo_00000190)
- 10- Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*. 2013; 280(10): 2471-6. DOI: [10.1111/febs.12126](https://doi.org/10.1111/febs.12126)
- 11- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, et al. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2003; 3(12): 2487-93. DOI: [10.1002/pmic.200300621](https://doi.org/10.1002/pmic.200300621)
- 12- Lagana SM, Salomao M, Bao F, Moreira RK, Lefkowitz JH, Remotti HE. Utility of an Immunohistochemical Panel Consisting of Glypican-3, Heat-shock Protein-70, and Glutamine Synthetase in the Distinction of Low-grade Hepatocellular Carcinoma From Hepatocellular Adenoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013; 21(2): 170-6. DOI: [10.1097/PAI.0b013e31825d527f](https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31825d527f)
- 13- Azam F, Koulaouzidis A. Hepatitis B virus and hepatocarcinogenesis. *Ann Hepatol*. 2008; 7(2): 125-9. DOI: [10.1016/S1665-2681\(19\)31867-8](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31867-8)
- 14- Ng S-A, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2011; 46(8): 974-90. DOI: [10.1007/s00535-011-0415-9](https://doi.org/10.1007/s00535-011-0415-9)
- 15- Sun Q, Wang Y, Zhang Y, Liu F, Cheng X, Hou N, et al. Expression profiling reveals dysregulation of cellular cytoskeletal genes in HBx-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther*. 2007; 6(5): 668-74. DOI: [10.4161/cbt.6.5.3955](https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.3955)
- 16- Gouas DA, Shi H, Hautefeuille AH, Ortiz-Cuaran SL, Legros PC, Szymanska KJ, et al. Effects of the TP53 p.R249S mutant on proliferation and clonogenic properties in human hepatocellular carcinoma cell lines: interaction with hepatitis B virus X protein. *Carcinogenesis*. 2010; 31(8): 1475-82. DOI: [10.1093/carcin/bgq118](https://doi.org/10.1093/carcin/bgq118)
- 17- Xie H-Y, Cheng J, Xing C-Y, Wang J-J, Su R, Wei X-Y, et al. Evaluation of hepatitis B viral replication and proteomic analysis of HepG2. 2.15 cell line after knockdown of HBx. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2011; 10(3): 295-302. DOI: [10.1016/s1499-3872\(11\)60049-0](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(11)60049-0)
- 18- Khanlari Z, Sabahi F, Hosseini SY, Ghaderi M. HCV NS3 Blocking Effect on IFN Induced ISGs Like Viperin and IL28 With and Without NS4A. *Hepat Mon*. 2014; 14(6): e17822. DOI: [10.5812/hepatmon.17822](https://doi.org/10.5812/hepatmon.17822)

- 19- Vermehren J, Aghemo A, Falconer K, Susser S, Lunghi G, Zeuzem S, Colombo M, Weiland O, Sarrazin C. Clinical significance of residual viremia detected by two realtime PCR assays for response-guided therapy of HCV genotype 1 infection. *J Hepatol.* 2014; 60(5): 913-9. DOI: [10.1016/j.jhep.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.01.002)
- 20- Ali N, Allam H, May R, Sureban SM, Bronze MS, Bader T, et al. Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts. *J Virol.* 2011; 85(23): 12292-303. DOI: [10.1128/JVI.05920-11](https://doi.org/10.1128/JVI.05920-11)
- 21- Cheng W, Tseng C-J, Lin TTC, Cheng I, Pan H-W, Hsu H-C, Lee Y. Glypican-3- mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis.* 2008; 29(7): 1319-26. DOI: [10.1093/carcin/bgn091](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn091)
- 22- Iwai A, Takegami T, Shiozaki T, Miyazaki T. Hepatitis C virus NS3 protein can activate the Notch-signaling pathway through binding to a transcription factor, SRCAP. *PloS one.* 2011; 6(6): e20718. DOI: [10.1371/journal.pone.0020718](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020718)
- 23- Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, Dasgupta A, French S. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology.* 2009; 50(6): 1756-64. DOI: [10.1002/hep.23232](https://doi.org/10.1002/hep.23232)