

بررسی ارزش پیش‌آگهی و بیان ژن TRIP13 در سرطان معده

فریبا منظوری^۱ (M.Sc.)، مهرداد نصرالله‌زاده ثابت^۲ (Ph.D.)، آرزو فرهادی^۳ (M.Sc.)، رضا حیدری^۴ (Ph.D.)، محمد فواد حیدری^۵ (Ph.D.)، جواد بهروزی^{۴*} (Ph.D.)

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران

۲- گروه فناوری‌های نوین و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

۳- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۴- مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

۵- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۹

jvdbehozi@gmail.com

۰۲۱۴۳۸۲۲۳۶۸ تلفن: نویسنده مسئول

چکیده

هدف: سرطان معده یک مشکل عمده برای سلامت عمومی در سراسر جهان است. عواملی که باعث به‌وجود آمدن این سرطان می‌شوند به خوبی شناخته نشده‌اند، اگرچه مشخص شده است که بیان نابه‌جای ژن‌ها با این سرطان در ارتباط می‌باشد. TRIP13 نقش‌های بسیار مهمی در نوترکیبی میوزی، ترمیم DNA و پیشرفت چرخه سلولی دارد. شواهد رو به رشدی نشان می‌دهند که TRIP13 ممکن است عملکردهای دیگری به غیر از میوز و میتوز داشته باشد، یکی از این عملکردها تنظیم تومورزایی است. هدف مطالعه حاضر مقایسه میزان بیان ژن TRIP13 در بافت‌های تومور و حاشیه تومور معده و ارزیابی ارزش بالینی آن در تحلیل میزان بقا و پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۵۰ جفت بافت توموری و حاشیه آن از بیماران مبتلا به سرطان معده جمع‌آوری گردید. ابتدا بیان نسبی ژن TRIP13 با استفاده از تکنیک qRT-PCR سنجیده و با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی‌سازی شد. در ادامه با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی و آنالیز پایگاه داده‌ها میزان بیان ژن TRIP13 در دو کوهورت مختلف از بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شد. همچنین یک مطالعه داده کاوی به منظور بررسی نقش بیان TRIP13 در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده انجام شد. در نهایت ارتباط بین میزان بیان و تعداد نسخه ژن TRIP13 با استفاده از آنالیز داده‌های پایگاه CCLC به دست آمد.

یافته‌ها: میانگین بیان ژن TRIP13 در نمونه‌های توموری بیماران نسبت به نمونه‌های بافت حاشیه‌ای افزایش ۵/۲ برابری نشان داد. این یافته در آنالیزهای بیوانفورماتیکی نیز تکرار شد و بیان ژن TRIP13 در هر دو کوهورت بیماران افزایش معنی‌داری نشان داد. بررسی هم‌بستگی میزان بیان ژن TRIP13 و تعداد نسخه‌های آن در ۳۷ رده سلولی سرطان معده نشان داد که میزان بیان این ژن ارتباط معنی‌داری با تعداد نسخه‌های آن دارد. همچنین هم‌بستگی منفی بین بیان بالای ژن TRIP13 و بقا کلی بیماران مبتلا به سرطان معده مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: ژن TRIP13 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر پیش‌آگهی‌دهنده امیدبخش و یک هدف درمانی احتمالی در تشخیص و درمان سرطان معده مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، TRIP13، بیان ژن، بقا کلی بیماران

مقدمه

(intestinal) و منتشره (diffuse) و ترکیبی (mixed) تقسیم‌بندی می‌شوند [۳،۲]. مرگ ناشی از این سرطان یازدهمین علت از همه مرگ‌ها بوده و تخمین زده می‌شود ۱/۸ درصد مرگ‌ها تا سال ۲۰۳۰ را به خود اختصاص خواهد داد [۴]. در ایران نیز سرطان معده دومین علت مرگ ناشی از سرطان و دومین سرطان در مردان با شیوع ۱۴ درصد

سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان می‌باشد و سالانه منجر به مرگ بیش از ۷۲۳ هزار نفر در سراسر دنیا می‌شود [۱]. بیش‌تر موارد این سرطان آدنوکارسینوما هستند که بر اساس طبقه‌بندی لورن (Lauren) به زیرگروه‌های روده‌ای

ارتباط بیان این ژن با ویژگی‌های کلینکوپاتولوژیکی و مدت زمان بقا بیماران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با مصوبه اخلاق به شناسه IR.AJAUMS.REC.1400.278 و بر روی ۵۰ نمونه بافت توموری و بافت حاشیه توموری انجام گردید. این نمونه‌ها از بانک تومور بیمارستان امام خمینی (ره) در شهر تهران تهیه گردید و از بیمارانی به دست آمده بود که در انستیتو کانسر تحت عمل جراحی سرطان معده قرار گرفته بودند. معیار ورود نمونه به مطالعه، آدنوکارسینوم‌های معده از نوع منتشره بودند که قبل از جراحی تحت شیمی‌درمانی قرار نگرفته باشند. نمونه‌ها با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شده و تا انجام آزمایشات در فریزر با دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: RNA تام طبق پروتکل محلول استخراج RNA (RNX-plus) شرکت سیناژن (ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. قبل از انجام استخراج نمونه‌های بافتی با استفاده از نیتروژن مایع و هاون به صورت پودر درآمد. RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراب تحت کنترل کیفی و کمی قرار گرفت و تا مرحله سنتز cDNA در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت ساخت cDNA از کیت شرکت BIOFACT (کره) استفاده گردید. برای این کار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با Master Mix, Random Hexamer و الیگو dT مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 50°C درجه سانتی‌گراد (جهت رونویسی معکوس) انکوبه گردید. در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای 90°C درجه سانتی‌گراد (جهت غیرفعال شدن آنزیم نسخه‌بردار معکوس توسط تیمار حرارتی) تیمار شد. محصول حاصل در -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

بررسی میزان بیان ژن: سطوح بیان ژن‌ها با تکنیک qRT-PCR و به وسیله ترموسایکلر StepOnePlus شرکت Applied Biosystems (آمریکا) اندازه‌گیری شد. حجم نهایی هر کدام از واکنش‌ها ۲۰ میکرولیتر بود که شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Biofact، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب، ۶ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و همچنین ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده بود. دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. در ادامه ۴۰ چرخه تکثیر شامل دناتوراسیون در دمای 90°C درجه به مدت ۲۰ ثانیه و اتصال و طول‌سازی در دمای

و چهارمین سرطان در زنان با شیوع ۷ درصد می‌باشد [۶،۵]. بیش‌تر موارد سرطان معده اسپورادیک هستند و تجمع خانوادگی حدود ۱۰ درصد از موارد را تشکیل می‌دهد [۷] و الگوی ارثی در ۱ تا ۳ درصد موارد دیده می‌شود [۸].

مکانیسم مولکولی دقیق سرطان معده هم‌چنان نامشخص است و به همین علت به عنوان یک فرایند پیچیده چند مرحله‌ای ناشی از میانکنش بین محیط و ژنتیک در نظر گرفته می‌شود. آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری، ویروس اپیستین بار و هم‌چنین نوع رژیم غذایی به عنوان عوامل اصلی محیطی در نظر گرفته می‌شوند [۹،۱۰].

مطالعات انجام شده در طی چنددهه گذشته باعث به وجود آمدن دید وسیعی در رابطه با تغییرات پیش برنده (driver) در سرطان معده شده است. این تغییرات شامل جهش‌های ژنی، تغییرات تعداد نسخه ژن‌ها، تغییرات ساختاری، تغییرات اپی‌ژنتیکی و تغییرات ترانسکریپتومی می‌باشند [۱۱-۱۳]. مانند بسیاری از تومورهای اپیتلیال جامد، سرطان معده اغلب با جهش‌های اکتسابی در ژن‌های متفاوتی همراه می‌باشد [۱۴،۱۵]. تغییر در تنظیم بیان ژن‌ها مشخصه دیگر سرطان معده می‌باشد. در اوایل سال ۲۰۰۰ مطالعات اولیه با استفاده از میکروآرای تغییرات بیان ژن‌های متفاوتی را در سرطان معده مشخص کرد که با نوع خاصی از زیرگروه‌های هیستولوژیکی، وضعیت تومور و یا وضعیت بالینی در ارتباط بودند [۱۶،۱۷].

ژن TRIP13 بر روی کروموزوم ۵ قرار دارد و یک پروتئین چاپرونی ۴۳۲ اسید آمینه‌ای متعلق به پروتئین‌های AAA از خانواده ATPase را کد می‌کند. نقش پروتئین‌های AAA، تنظیم جداسازی و گردهمایی کمپلکس‌های پروتئینی مختلف می‌باشد [۱۸،۱۹]. هم‌چنین TRIP13 برای شکست و نوآرایی DNA، سیناپس کروموزومی و تنظیم نقطه بازرسی میتوزی مورد نیاز می‌باشد [۲۰]. در طی سال‌های گذشته شواهد گوناگونی نشان‌دهنده نقش این ژن در پیشرفت و تهاجم تومورها بوده است. به عنوان مثال مشخص شده است که در کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سر و گردن، افزایش بیان TRIP13 منجر به افزایش قدرت تهاجم تومور و مقاومت آن در برابر درمان می‌شود [۲۱].

با وجود مطالعات مختلفی که در رابطه با تغییرات بیان TRIP13 در سرطان‌های مختلف صورت گرفته است، هنوز در مورد تغییرات بیان و نقش این ژن در سرطان معده سوالات بدون جواب زیادی وجود دارد. بنابراین، هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی و مقایسه میزان بیان ژن TRIP13 در بافت‌های توموری و حاشیه توموری سرطان معده و هم‌چنین ارزیابی

۵۹۲ بیمار مبتلا به سرطان معده می‌باشند. این بیماران بر اساس میانه بیان ژن TRIP13 در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم‌بندی شده و مدت زمان بقاء آن‌ها سنجیده و مقایسه شد.

ارتباط تعداد نسخه و بیان ژن: به منظور بررسی ارتباط بین بیان ژن TRIP13 با تعداد نسخه‌های ژن، داده‌های مربوط به بیان و تعداد نسخه این ژن در رده‌های سلولی مختلف از دانشنامه رده‌های سلولی سرطان (CCLE) بازیابی گردید [۲۷]. در نهایت اطلاعات مربوط به ۳۷ رده سلولی سرطان معده آنالیز شد.

آنالیز آماری: جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن تغییرات بیان ژن از آزمون آماری T جفت شده برای نمونه‌های توموری و حاشیه توموری به دست آمده از یک بیمار و از آزمون آماری T جفت نشده برای نمونه‌های تومور و حاشیه تومور بیماران مختلف استفاده گردید. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن TRIP13 با ویژگی‌های دموگرافیک و پاتولوژیکی بیماران از آزمون Chi-Square استفاده شد. ارتباط بین بیان ژن و تعداد نسخه آن با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون آنالیز شد. همچنین برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت مدت زمان بقاء در بیماران با بیان بالا و پایین ژن TRIP13 از آزمون Mantel-Cox استفاده گردید. در تمامی موارد $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در پژوهش حاضر در مجموع نمونه‌های مربوط به ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان معده با میانگین سنی ۶۳ سال که شامل ۳۲ مرد و ۱۸ زن بود، مورد بررسی و تجزیه تحلیل قرار گرفت. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن TRIP13 نشان داد، به طور میانگین میزان بیان این ژن در نمونه‌های تومور ۵/۲ برابر بیش‌تر از نمونه‌های حاشیه‌ای می‌باشد (شکل ۱- A). همچنین آنالیز آماری این نتایج نشان داد که این افزایش بیان از نظر آماری معنی‌دار ($P < 0.001$) می‌باشد (شکل ۱- B).

جهت بررسی بیش‌تر بیان ژن TRIP13 در سرطان معده از آنالیز داده‌های RNA-seq به‌دست آمده از دو مطالعه دیگر استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بیان این ژن در یک کوهورت از نمونه‌های توموری بیماران نسبت به نمونه‌های حاشیه تومور بالاتر بود و در تمامی مراحل بیماری سرطان معده نسبت به بافت مجاور تومور افزایش معنی‌داری داشت. در یک مطالعه دیگر نیز که متشکل از ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان معده بود، مشخص شد بیان این ژن در

۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در نهایت بررسی منحنی ذوب در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. کمی‌سازی نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید. در این تحقیق بر اساس مطالعات قبلی از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. طراحی پرایمر با توجه به توالی ژن‌های انسانی و با استفاده از ابزار Primer BLAST و سایت NCBI انجام گردید. ویژگی‌های پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

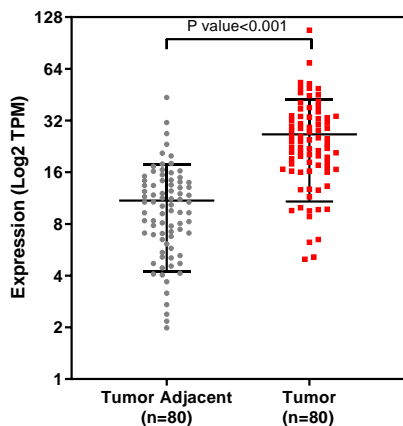
جدول ۱. توالی و ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده

ژن	پرایمر	توالی	اندازه محصول
GAPDH	رو به جلو	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	۱۱۲ جفت باز
	رو به عقب	TCCACCACCCTGTGTCTGTAG	
TRIP13	رو به جلو	CTGTCTCTGGCAGTGGACAAG	۱۶۳ جفت باز
	رو به عقب	TTGGTTTGCAGAAGGGATTC	

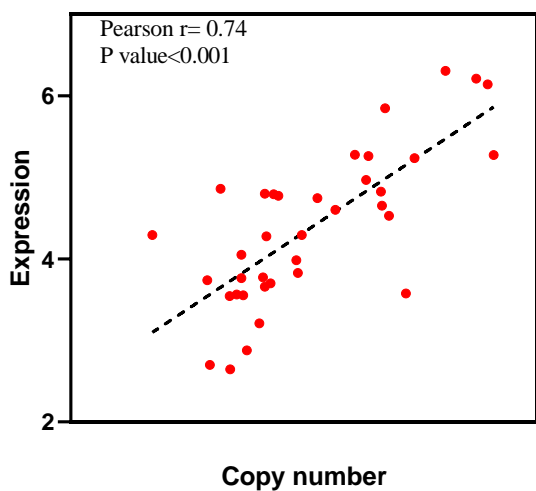
داده کاوی (Data Mining) بیوانفورماتیکی بیان ژن: به منظور بررسی بیش‌تر تغییرات بیان ژن TRIP13 در نمونه‌های تومور و بافت حاشیه تومور از دو پایگاه داده بیوانفورماتیکی دیگر استفاده شد. در ابتدا خوانش‌های توالی‌یابی مربوط به ۸۰ جفت نمونه آدنوکارسینوم معده و بافت حاشیه آن از پایگاه داده Gene Expression Omnibus (GEO) بازیابی گردید [۲۲]. پس از مراحل کنترل کیفی داده‌ها و حذف خوانش‌های بی‌کیفیت پایین، از نرم‌افزار Hisat2 جهت مکان‌یابی این خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع استفاده گردید [۲۳]. جهت تخمین دقیق‌تر میزان بیان ژن، خوانش‌های دوتایی با استفاده از نرم‌افزار MarkDuplicate حذف شدند [۲۴]. در نهایت میزان بیان ژن TRIP13 در هر کدام از نمونه‌ها بر حسب تعداد نسخه در هر میلیون خوانش (TPM; Transcript Per Million) محاسبه گردید. همچنین میزان بیان ژن TRIP13 در ۳۵ بافت حاشیه تومور معده و ۳۶۱ بافت تومور معده از پایگاه داده TCGA بازیابی گردید [۲۵] و میزان بیان این ژن در مراحل مختلف سرطان مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز مدت زمان بقاء: با توجه به گذشت مدت زمان محدود از نمونه‌گیری‌های بالینی، امکان انجام آنالیزهای بقاء بر روی این بیماران وجود نداشت. به همین منظور اطلاعات میزان بیان ژن TRIP13 و مدت زمان بقاء بیماران مبتلا به سرطان معده مربوط به مطالعه‌های GSE15459، GSE29272، GSE14210، GSE51105 و GSE22377 از پایگاه داده کاپلان-مایر دریافت گردید [۲۶] و بر اساس این اطلاعات منحنی‌های مختلف مدت زمان بقاء برای بیماران رسم شد. این مطالعات در مجموع شامل اطلاعات بیان ژن و مدت زمان بقاء

همخوانی و همبستگی بسیار بالایی دارد ($r=0.74$) و ($P<0.001$).



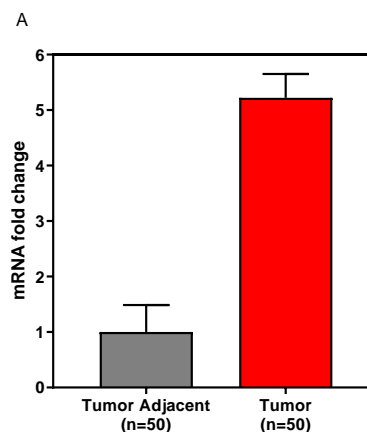
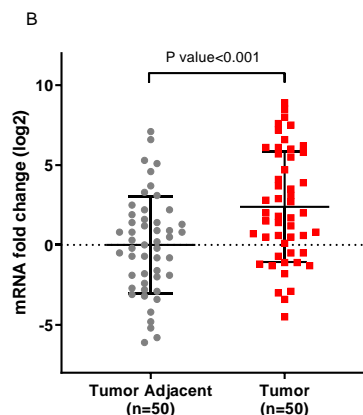
شکل ۳. بیان ژن TRIP13 در بافت های تومور و حاشیه تومور یک کوهورت با ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان معده. بیان این ژن در ۸۰ جفت نمونه تومور و حاشیه تومور از بیماران پایگاه داده GEO افزایش ۲ برابری نشان می دهد این میزان افزایش از لحاظ آماری نیز معنی دار می باشد.



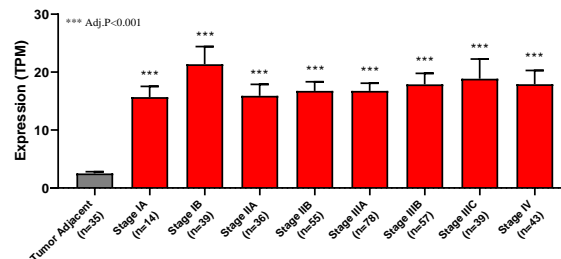
شکل ۴. ارتباط بین بیان و تعداد نسخه های ژن TRIP13 در رده های سلولی سرطان معده. با افزایش تعداد نسخه های ژن TRIP13 میزان بیان این ژن در رده های سلولی مختلف سرطان معده افزایش پیدا می کند.

به منظور بررسی اثرات بالینی بیان ژن TRIP13 از اطلاعات مربوط به مدت زمان بقاء و میزان بیان این ژن استفاده شد. این اطلاعات از پایگاه داده کاپلان-مایر دریافت و بیماران بر اساس میزان بیان ژن TRIP13 در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم بندی شدند. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود، در بین ۵۹۲ بیمار مبتلا به سرطان معده

نمونه های توموری نسبت به نمونه های حاشیه تومور افزایش معنی داری پیدا می کند (شکل ۳).



شکل ۱. تغییرات بیان ژن TRIP13 در نمونه های بالینی بیماران مبتلا به سرطان معده. میزان بیان این ژن در نمونه های تومور ۵/۲ برابر بیشتر از بافت حاشیه تومور می باشد (A) و این افزایش بیان از لحاظ آماری معنی دار است (B).



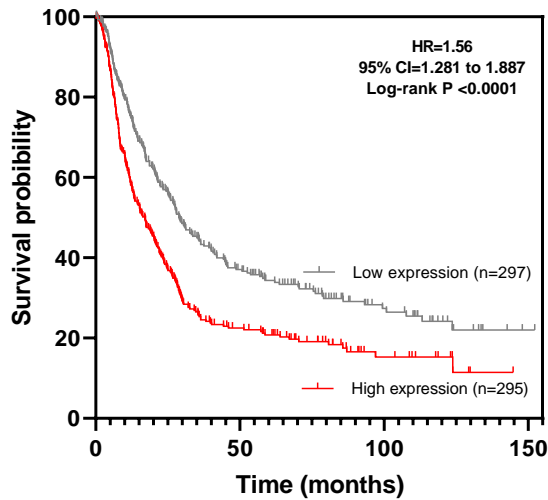
شکل ۱. بیان ژن TRIP13 در مراحل مختلف سرطان معده. بیان این ژن در تمامی مراحل سرطان معده نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش معنی داری نشان می دهد.

به منظور بررسی دلیل افزایش میزان بیان ژن TRIP13 در بافت سرطانی، همبستگی بیان و تعداد نسخه این ژن در ۳۷ رده مربوط به سرطان معده بررسی شد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود، در هر کدام از رده های سلولی میزان بیان با تعداد نسخه مرتبط بوده و در کل رده های سلولی بررسی آماری نشان داد میزان بیان این ژن با تعداد نسخه های آن

جدول ۱: همبستگی میزان بیان ژن TRIP13 با متغیرهای دموگرافیک و پاتولوژیکی بیماران

مقدار P	بیان TRIP13		متغیر
	پایین (۳۳)	بالا (۱۷)	
سن			
۰/۶۱۵۷	۱۸	۸	بالای ۶۳ سال
	۱۵	۹	زیر ۶۳ سال
جنس			
۰/۴۸۶۱	۲۰	۱۲	مرد
	۱۳	۵	زن
استعمال سیگار			
۰/۱۳۶۴	۲۶	۱۰	ندارد
	۷	۷	دارد
استعمال الکل			
۰/۴۸۱۳	۳۱	۱۵	ندارد
	۲	۲	دارد
استعمال مواد مخدر			
۰/۲۳۵۱	۲۷	۱۶	ندارد
	۶	۱	دارد
متاستاز			
۰/۰۰۲۲	۳۱	۱۰	ندارد
	۲	۷	دارد
محل تومور اولیه			
۰/۸۰۶۰	۱۰	۶	آنتروم
	۱۱	۵	بدنه معده
	۸	۴	کاردیا
	۴	۲	فوندوس
سطح تمایز			
۰/۰۴۰۴	۹	۰	خوب
	۸	۳	متوسط
	۱۰	۶	ضعیف
	۶	۸	بدون تمایز
اندازه تومور اولیه			
۰/۰۰۱۹	۲۳	۴	بیشتر از ۵/۸ سانتی متر
	۱۰	۱۳	کمتر از ۵/۸ سانتی متر

احتمال بقاء کلی برای بیماران با بیان بالای ژن TRIP13 نسبت به بیماران با بیان پایین به طرز چشمگیری کمتر می‌باشد. مطالعه ما نشان داد که میانگین زمان بقاء برای بیماران مبتلا به سرطان معده که بیان بالای این ژن را دارند برابر با ۱۷ ماه و در طرف مقابل برای بیمارانی که بیان پایین این ژن را دارند برابر با ۲۹ ماه می‌باشد.



شکل ۵. احتمال بقاء بیماران مبتلا به سرطان معده در دو گروه بیان بالا و پایین ژن TRIP13. بقاء کلی بیماران با بیان بالای ژن TRIP13 نسبت به بیماران با بیان پایین این ژن به طرز معنی داری کمتر می‌باشد.

به منظور بررسی ارتباط بین ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیکی بیماران با میزان بیان ژن TRIP13، نمونه‌های توموری بیماران بر اساس میانگین بیان این ژن در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم‌بندی شدند. سپس ارتباط بین متغیرهای مختلف و میزان بیان سنجیده شد. بر این اساس ۱۷ بیمار دارای بیان بالاتر از میانگین بیان کل بیماران و در مقابل ۳۳ بیمار دارای بیان کمتر از میانگین بودند. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، ارتباط معنی‌داری بین میزان بیان این ژن و متغیرهای دموگرافیک شامل سن، جنس، مصرف سیگار، مواد مخدر و الکل دیده نشد. در طرف مقابل ارتباط معنی‌داری میان بیان بالای ژن TRIP13 و ویژگی‌های پاتولوژیکی نامطلوب سرطان شامل وجود متاستاز ($P=۰/۰۰۲۲$)، سطح تمایز ($P=۰/۰۴۰۴$) و اندازه اولیه تومور ($P=۰/۰۰۱۹$) دیده شد. هم‌چنین نتایج مطالعه ما نشان داد ارتباطی بین بیان ژن و محل اولیه تومور وجود ندارد ($P=۰/۸۰۶$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن TRIP13 در نمونه‌های تومور معده نسبت به بافت حاشیه‌ای افزایش چشمگیری پیدا می‌کند و این افزایش بیان با ویژگی‌های نامطلوب تومور و کاهش طول عمر بیماران در ارتباط می‌باشد. افزایش بیان این ژن در سرطان‌های مختلف گزارش شده است. در مطالعه Sheng و همکاران، مشخص گردید بیان این ژن در سرطان کلورکتال افزایش پیدا کرده و باعث رشد تومور می‌شود. مطالعه این گروه نشان داد که افزایش بیان این ژن با پیش‌آگهی نامطلوب سرطان کلورکتال نیز در ارتباط

نامطلوب همراه می‌باشد [۴۱]. چندین مطالعه نیز ارتباط مستقیم افزایش بیان TRIP13 را با پیش‌آگهی نامطلوب در سرطان‌های سینه، کبد و مالتیپل میلوما گزارش کرده‌اند [۴۳، ۴۲].

نتایج ما نشان داد بیان بالای ژن TRIP13 با متاستاز، اندازه بزرگ‌تر و سطح تمایز کم‌تر تومور معده در ارتباط است. مطالعات دیگری نیز ارتباط بیان این ژن با ویژگی‌های نامطلوب تومور را گزارش کرده‌اند. Sheng و همکاران گزارش کردند که TRIP13 باعث افزایش میزان تکثیر، مهاجم و مهاجرت سلول‌ها و همچنین تشکیل خوبه‌خودی تومورهای کلورکتال می‌شود [۲۸]. Dazhi و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی بیان ژن TRIP13 در کارسینوم هیپاتوسلولار انجام دادند مشاهده نمودند بیان بالای این ژن با متاستاز به گره‌های لنفاوی، مرحله بالاتر سرطان و همچنین اندازه بزرگ‌تر تومور در ارتباط می‌باشد [۴۲]. هم‌چنین در مطالعه Yao و همکاران مشخص گردید، خاموش‌سازی ژن TRIP13 باعث مهار تکثیر و مهاجرت سلولی شده و همچنین میزان تشکیل تومورهای کبدی را پایین می‌آورد [۴۱]. این یافته‌ها تقویت‌کننده این فرضیه است که TRIP13 نقش مهمی در تشکیل تومور و متاستاز دارد.

تحقیق حاضر نشان داد بیان ژن TRIP13 در سرطان معده تنظیم افزایشی دارد و این افزایش بیان با ویژگی‌های نامطلوب تومور معده مانند متاستاز، عدم تمایز و اندازه تومور ارتباط مستقیم دارد. هم‌چنین افزایش بیان این ژن با کاهش طول عمر بیماران مرتبط می‌باشد. با توجه به این یافته‌ها، افزایش بیان ژن TRIP13 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر برای ارزیابی پیش‌آگهی سرطان معده مطرح بوده و هدف‌گیری این ژن می‌تواند دارای پتانسیل درمانی در این سرطان کشنده باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارتش جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است؛ جواد بهروزی و مهرداد نصرالله‌زاده: ایده و طراحی مطالعه، آرزو فرهادی و فریبا منظوری: جمع‌آوری داده‌ها، رضا حیدری و محمد فواد حیدری: آنالیز و تفسیر نتایج، جواد بهروزی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

است [۲۸]. هم‌چنین مطالعه دیگری که توسط Aziz و همکاران انجام شد، نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن در سرطان کلورکتال بود [۲۹]. هدف‌گیری TRIP13 با استفاده از مولکول‌های کوچک DCZ0415 باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی کلورکتال می‌شود [۳۰]. از طرفی افزایش بیان این ژن در چندین مطالعه مرتبط با سرطان سینه گزارش شده است [۳۱-۳۳]. در مطالعه‌ای که توسط Banerjee و همکاران انجام گردید، افزایش بیان این ژن در سرطان سر و گردن مشاهده شد [۲۱]. در بین سرطان‌های خونی نیز افزایش بیان ژن TRIP13 در مالتیپل میلوما [۳۴]، لنفوم سلول T [۳۵] و لوسمی حاد لنفوسیتی [۳۶] گزارش شده است.

TRIP13 یکی از ژن‌های مرتبط با نقطه بازرسی دوک تقسیم می‌باشد، بیان این ژن‌ها در اغلب سلول‌های توموری از تنظیم خارج می‌شوند. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که عدم تنظیم این ژن‌ها منجر به ناپایداری کروموزومی و آنیپلوئیدی شده و می‌تواند در تومورزایی نقش داشته باشد [۳۸، ۳۷]. ناک داون TRIP13 باعث توقف چرخه سلولی و جلوگیری از انتقال سلول از متافاز به آنافاز می‌شود [۳۹]، این گزارش‌ها نشان می‌دهند این ژن نقش مهمی در پیشبرد چرخه سلولی دارد.

مطالعه ما نشان داد هم‌بستگی قوی و معنی‌داری میان تعداد نسخه‌های ژن TRIP13 و بیان این ژن در رده‌های سلولی سرطان معده وجود دارد. هم‌راستا با این یافته، نتایج Loo و همکاران نشان داد ارتباط معنی‌داری میان تعداد نسخه و بیان ژن TRIP13 در سرطان ریه وجود دارد و افزایش تعداد نسخه‌های این ژن همراه با افزایش بیان و پیشرفت تومور می‌باشد [۴۰]. هم‌چنین مشخص شده است در سرطان دهانه رحم، سرطان ریه، سرطان مثانه، سرطان تخمدان و ملانوما افزایش تعداد نسخه‌های این ژن همراه با افزایش میزان بیان آن می‌باشد [۲۱]. به نظر می‌رسد که افزایش تعداد نسخه‌های ژن TRIP13 می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای افزایش بیان این ژن در سرطان‌های مختلف باشد، هر چند جهت نتیجه‌گیری قطعی‌تر نیاز به مطالعات بیش‌تری می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که افزایش بیان ژن TRIP13 با پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به سرطان معده مرتبط می‌باشد. مطالعات دیگری نیز پیش‌آگهی بیان بالای این ژن را در سرطان‌های مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند. مشخص شده است که در سرطان کلورکتال بیماران که بیان بالای این ژن را دارند، از طول عمر کم‌تری برخوردار هستند [۲۸]. هم‌چنین در کارسینوم هیپاتوسلولار افزایش بیان TRIP13 با پیش‌آگهی

<https://doi.org/10.1038/nature12213>

PMid:23770567 PMCID:PMC3919509

[15] Niapour N, Shokri Gara Geshlagi S, Amani M, Sharifi Pasandi M, Salehi H, Niapour A. Effects of all trans retinoic acid on apoptosis induction and notch1, hes1 genes expression in gastric cancer cell line MKN-45. *Koomesh* 2016; 17: 1024-1032. (Persian).

[16] Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3208-3215.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0833>

PMid:12925757 PMCID:PMC181561

[17] Ramezankhani R, Solhi R, Es HA, Vosough M, Hassan M. Novel molecular targets in gastric adenocarcinoma. *Pharmacol Ther* 2021; 220: 107714.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107714>

PMid:33172596

[18] Xie W, Wang S, Wang J, de la Cruz MJ, Xu G, Scaltriti M, et al. Molecular mechanisms of assembly and TRIP13-mediated remodeling of the human Shieldin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2024512118>

PMid:33597306 PMCID:PMC7923543

[19] Liu X, Shen X, Zhang J. TRIP13 exerts a cancer-promoting role in cervical cancer by enhancing Wnt/ β -catenin signaling via ACTN4. *Environ Toxicol* 2021; 36: 1829-1840.

<https://doi.org/10.1002/tox.23303>

PMid:34061428

[20] Vader G. Pch2 TRIP13: controlling cell division through regulation of HORMA domains. *Chromosoma* 2015; 124: 333-339.

<https://doi.org/10.1007/s00412-015-0516-y>

PMid:25895724

[21] Banerjee R, Russo N, Liu M, Basrur V, Bellile E, Palanisamy N, et al. TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer. *Nat Commun* 2014; 5: 1-18.

<https://doi.org/10.1038/ncomms5527>

PMid:25078033 PMCID:PMC4130352

[22] Clough E, Barrett T. The gene expression omnibus database. *Methods Mol Biol* 2016; 1418: 93-110.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5

PMid:27008011 PMCID:PMC4944384

[23] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 2015; 12: 357.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>

PMid:25751142 PMCID:PMC4655817

[24] Ebbert MT, Wadsworth ME, Staley LA, Hoyt KL, Pickett B, Miller J, et al. Evaluating the necessity of PCR duplicate removal from next-generation sequencing data and a comparison of approaches. *BMC Bioinformatics* 2016; 17: 239.

<https://doi.org/10.1186/s12859-016-1097-3>

PMid:27454357 PMCID:PMC4965708

[25] Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The cancer genome atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015; 19: A68-77.

<https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>

PMid:25691825 PMCID:PMC4322527

[26] Szász AM, Lániczky A, Nagy Á, Förster S, Hark K, Green JE, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget* 2016; 7: 49322.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10337>

PMid:27384994 PMCID:PMC5226511

[27] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012; 483: 603-607.

<https://doi.org/10.1038/nature11003>

PMid:22460905 PMCID:PMC3320027

[28] Sheng N, Yan L, Wu K, You W, Gong J, Hu L, et al. TRIP13 promotes tumor growth and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1-14.

<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0434-z>

PMid:29540729 PMCID:PMC5852242

[1] Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJ, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 239.

<https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>

PMid:29445300 PMCID:PMC5808709

[2] Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.

<https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>

PMid:14320675

[3] Kalbasi M, Siadati S, Kamali Ahangar S, Nikbakhsh N. Clinicopathologic Characteristics of Multifocal Gastric Adenocarcinoma. *J Babol Univ Med Sci* 2019; 21: 147-152. (Persian).

[4] Thrift AP, Nguyen TH. Gastric cancer epidemiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2021; 31: 425-439.

<https://doi.org/10.1016/j.giec.2021.03.001>

PMid:34053631

[5] Almasi Z, Rafiemanesh H, Salehiniya H. Epidemiology characteristics and trends of incidence and morphology of stomach cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 2757-2761.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.7.2757>

PMid:25854359

[6] Samadani AA, Mansour-Ghanaie F, Joukar F, Safizadeh M, Nourollahi SE, Rashidy-Pour A. Performance of methylation and expression fluctuations of sonic hedgehog genes in gastric adenocarcinoma. *Koomesh* 2019; 21: 215-224. (Persian).

[7] Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 765-770.

<https://doi.org/10.5858/2004-128-765-DTITIA>

PMid:15214826

[8] Taja-Chayeb L, Vidal-Millán S, Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Chávez-Blanco A, Domínguez-Gómez G, et al. Hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). An overview. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2022; 46: 101820.

<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101820>

PMid:34656755

[9] Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarzadeh MR, Mahmoodzadeh H. ADAR expression and copy number variation in patients with advanced gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2020; 20: 1-9.

<https://doi.org/10.1186/s12876-020-01299-8>

PMid:32410589 PMCID:PMC7227226

[10] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 264-279.

<https://doi.org/10.3322/caac.21657>

PMid:33592120 PMCID:PMC9927927

[11] Nadauld LD, Garcia S, Natsoulis G, Bell JM, Miotke L, Hopmans ES, et al. Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2as a cancer driver in diffuse gastric cancer. *Genome Biol* 2014; 15: 428.

<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0428-9>

PMid:25315765 PMCID:PMC4145231

[12] Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* 2014; 46: 573-582.

<https://doi.org/10.1038/ng.2983>

PMid:24816253

[13] Liang L, Fang JY, Xu J. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy. *Oncogene* 2016; 35: 1475-1482.

<https://doi.org/10.1038/onc.2015.209>

PMid:26073079

[14] Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; 499: 214.

- leukemia. *Oncotarget* 2017; 8: 25469.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16038>
 PMid:28424416 PMCid:PMC5421944
- [37] Bakhoun SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *J Clin Invest* 2012; 122: 1138-1143.
<https://doi.org/10.1172/JCI59954>
 PMid:22466654 PMCid:PMC3314464
- [38] Ma HT, Poon RY. TRIP13 functions in the establishment of the spindle assembly checkpoint by replenishing O-MAD2. *Cell Reports* 2018; 22: 1439-1450.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.027>
 PMid:29425500
- [39] Wang K, Sturt-Gillespie B, Hittle JC, Macdonald D, Chan GK, Yen TJ, et al. Thyroid hormone receptor interacting protein 13 (TRIP13) AAA-ATPase is a novel mitotic checkpoint-silencing protein. *J Biol Chem* 2014; 289: 23928-23937.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585315>
 PMid:25012665 PMCid:PMC4156041
- [40] Loo LW, Tiirikainen M, Cheng I, Lum-Jones A, Seifried A, Church JM, et al. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52: 450-466.
<https://doi.org/10.1002/gcc.22043>
 PMid:23341073 PMCid:PMC4019504
- [41] Yao J, Zhang X, Li J, Zhao D, Gao B, Zhou H, et al. Silencing TRIP13 inhibits cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating of TGF- β 1/smad3. *Cancer Cell Intern* 2018; 18: 208.
<https://doi.org/10.1186/s12935-018-0704-y>
 PMid:30564064 PMCid:PMC6296061
- [42] Dazhi W, Mengxi Z, Fufeng C, Meixing Y. Elevated expression of thyroid hormone receptor-interacting protein 13 drives tumorigenesis and affects clinical outcome. *Biomark Med* 2017; 11: 19-31.
<https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0169>
 PMid:27827544
- [43] Maurizio E, Wiśniewski JR, Ciani Y, Amato A, Arnoldo L, Penzo C, et al. Translating proteomic into functional data: an high mobility group A1 (HMGA1) proteomic signature has prognostic value in breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2016; 15: 109-123.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M115.050401>
 PMid:26527623 PMCid:PMC4762532
- [29] Aziz NA, Mokhtar NM, Harun R, Mollah MM, Rose IM, Sagap I, et al. A 19-Gene expression signature as a predictor of survival in colorectal cancer. *BMC Med Genomics* 2016; 9: 58.
<https://doi.org/10.1186/s12920-016-0218-1>
 PMid:27609023 PMCid:PMC5016995
- [30] Agarwal S, Afaq F, Bajpai P, Kim HG, Elkholy A, Behring M, et al. DCZ0415, a small-molecule inhibitor targeting TRIP13, inhibits EMT and metastasis via inactivation of the FGFR4/STAT3 axis and the Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer. *Mol Oncol* 2022; 16: 1728-1745.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13201>
 PMid:35194944 PMCid:PMC9019876
- [31] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9309-9314.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401994101>
 PMid:15184677 PMCid:PMC438973
- [32] Martin KJ, Patrick DR, Bissell MJ, Fournier MV. Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS One* 2008; 3: e2994.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002994>
 PMid:18714348 PMCid:PMC2500166
- [33] Nieto-Jiménez C, Alcaraz-Sanabria A, Páez R, Pérez-Peña J, Corrales-Sánchez V, Pandiella A, et al. DNA-damage related genes and clinical outcome in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 62834.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10886>
 PMid:28968952 PMCid:PMC5609884
- [34] Tao Y, Yang G, Yang H, Song D, Hu L, Xie B, et al. TRIP13 impairs mitotic checkpoint surveillance and is associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8: 26718.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14957>
 PMid:28157697 PMCid:PMC5432292
- [35] Van Kester MS, Borg MK, Zoutman WH, Out-Luiting JJ, Jansen PM, Dreef EJ, et al. A meta-analysis of gene expression data identifies a molecular signature characteristic for tumor-stage mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2050-2059.
<https://doi.org/10.1038/jid.2012.117>
 PMid:22513784
- [36] Zhou K, Zhang W, Zhang Q, Gui R, Zhao H, Chai X, et al. Loss of thyroid hormone receptor interactor 13 inhibits cell proliferation and survival in human chronic lymphocytic

Evaluation of the Prognostic Value and TRIP13 gene Expression in Gastric Cancer

Fariba Manzoori (M.Sc)¹, Mehrdad Nasrollahzadeh Sabet (Ph.D)², Arezoo Farhadi (M.Sc)³, Reza Heidari (Ph.D)⁴, Mohammad Foad Heidari (Ph.D)⁵, Javad Behroozi (Ph.D)^{*2,4}

1- Dept. of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran

2 – Dept. of Genetics and Advanced Medical Technology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Dept. of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

4- Research Center for Cancer Screening and Epidemiology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Dept. of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Health Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21 43822368 jvdbehroozi@gmail.com

Received: 26 Jan 2021; Accepted: 30 May 2022

Introduction: Gastric cancer is a major public health issue worldwide. The factors that initiate cancer are not well understood, however aberrant expression of genes is associated with this cancer. TRIP13 plays pivotal roles in meiotic recombination, DNA repair, and cell cycle progression. An increasing body of evidence suggests that TRIP13 may possess functions other than meiosis and mitosis, particularly in the regulation of tumorigenicity. This study aimed to compare the expression of the TRIP13 gene in cancerous and adjacent tissue of gastric cancer and evaluate its clinical significance in the prognosis and survival analysis of gastric cancer patients.

Materials and Methods: A total of 50 tumor tissues and marginal control tissues were obtained from gastric cancer patients. First, the relative gene expression of TRIP13 was determined using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and quantified using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Then, bioinformatic approaches were used to evaluate TRIP13 expression in two different cohorts of patients. A data mining study was also performed to determine the prognostic role of TRIP13 expression in the overall survival of gastric cancer patients. Finally, the correlation between gene expression and copy number of TRIP13 was obtained using CCLE database data analysis

Results: The expression of TRIP13 in gastric tumor samples was increased 5.2-fold relative to adjacent normal tissues. Conspicuously, this finding was repeated in bioinformatics analyses and TRIP13 gene expression showed a significant increase in both cohorts of patients. Analysis of TRIP13 gene expression in 37 gastric cancer cell lines showed that the expression of this gene was significantly correlated with the number of copies. We also found a negative correlation between the high expression of TRIP13 and overall survival in gastric cancer patients.

Conclusion: It could be concluded that TRIP13 may act as a promising biomarker and a potential therapeutic target for gastric cancer diagnosis and treatment.

Keywords: Gastric cancer, TRIP13, Gene expression, Overall survival of patients