

Evaluation of DPT Metastasis Suppressor Gene Expression in Human Gastric Cancer

Sara Rafi Taheri¹, Arezoo Farhadi², Zahra Shahsavari Haghghi³, Ebrahim Hazrati⁴, Mohammad Foad Heidari⁵, Peyman Aslani⁶, Mojgan Mohammadimehr⁷, Reza Heidari⁸, Ali Zarei⁹, Javad Behroozi^{8,10}

1.MSc student, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0015-2904

2.MSc student, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1988-8102

3.MSc student, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5605-744X

4.Associated professor, Department of Anesthesiology and Critical Care, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6987-7404

5.Assistant professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Health Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8310-331X

6.Assistant professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2556-8826

7.Assistant professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Health Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9210-0687

8.Assistant professor, Research Center for Cancer Screening and Epidemiology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2985-8396

9.MSc student, Medical Biotechnology, AJA Research Center University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5609-0266

10.Assistant professor, Department of Genetics and Advanced Medical Technology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel: +98 21 43822368, E-mail: jvdbehroozi@gmail.com, ORCID ID: 0000-0001-6429-0295

ABSTRACT

Background and Aim: Gastric carcinoma (GC) is one of the most common human cancers. Many genes have been analyzed in an attempt to better understand the process of gastric carcinogenesis, however, the underlying mechanism of gastric carcinogenesis is still poorly understood. Dermato-pontin (DPT) is an extracellular matrix protein, which regulates multiple physiological processes. The present study aimed to evaluate DPT gene expression in GC.

Materials and Methods: Biopsies of 50 surgically-excised GC tissue specimens and corresponding adjacent normal tissues were examined by real-time PCR. Then, using a bioinformatics analysis we determined DPT gene expression in two different cohorts of GC patients. To determine the effect of DPT expression levels on survival outcome, a Kaplan–Meier analysis was performed. For a comprehensive analysis, DPT gene expression was evaluated in 16 different cancers.

Results: RT-PCR demonstrated that DPT gene expression was decreased in gastric cancer tissues, compared to that in the normal stomach tissues. Mean DPT expression value was significantly lower in different stages of GC. Further, survival analysis revealed that the mRNA expression of DPT is positively correlated with overall survival of GC patients. A relationship was found between DPT expression and primary size of tumor. Pan-cancer analysis in 16 tumor types showed that DPT expression was lower in tumor tissue than in the adjacent normal tissue.

Conclusion: These findings suggested that the decrease in DPT gene expression in gastric tissue may play an important role in gastric carcinogenesis.

Keywords: Gastric cancer, DPT, Gene expression, Metastasis.

Received: Dec 28, 2022

Accepted: July 11, 2023

How to cite the article: Sara Rafi Taheri, Arezoo Farhadi, Zahra Shahsavari Haghghi, Ebrahim Hazrati, Mohammad Foad Heidari, Peyman Aslani, Mojgan Mohammadimehr, Reza Heidari, Ali Zarei, Javad Behroozi Evaluation of DPT Metastasis Suppressor Gene Expression in Human Gastric Cancer. *SJKU* 2024;29(2):24-37.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

ارزیابی بیان ژن مهار کننده متاستاز DPT در سرطان معده انسان

سارا رفیع طاهری^۱، آرزو فرهادی^۲، زهرا شهباز حقیقی^۳، ابراهیم حضرتی^۴، محمد فؤاد حیدری^۵، پیمان اصلانی^۶، مؤگان محمدی مهر^۷، رضا حیدری^۸، علی زارعی^۹، جواد بهروزی^{۱۰}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۳-۰۰۰۰-۲۹۰۴-۰۰۱۵

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۳-۰۰۰۰-۸۱۰۲-۱۹۸۸

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۲-۰۰۰۰-X۷۴۴-۵۶۰۵

۴. دانشیار، گروه بیوشی و مراقبت‌های ویژه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: ۷۴۰۴-۶۹۸۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۵. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: X۳۳۱-۸۳۱۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۶. استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: ۸۸۲۶-۲۵۵۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۷. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۶۸۷-۹۲۱۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۸. استادیار، مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: ۸۳۹۶-۲۹۸۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۹. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۲۶۶-۵۶۰۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۱۰. استادیار، گروه فناوری‌های نوین و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۴۳۸۲۲۳۶۸، پست الکترونیکی: jvdbehroozi@gmail.com کد ارکید: ۰۲۹۵-۶۴۲۹-۰۰۰۱-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: کارسینوم معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌های انسانی است. به منظور درک فرایند شروع و پیشرفت این سرطان ژن‌های زیادی مورد بررسی قرار گرفته‌اند؛ اما مکانسیم دقیق سرطان‌زایی به طور کامل شناخته شده نیست. درماتوپوتین (DPT) یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی است که فرایندهای سلولی فیزیولوژیکی متعددی را تنظیم می‌کند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن DPT در سرطان معده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های بیوپسی مربوط به ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان معده و همچنین بافت مجار نرمال آن‌ها که با استفاده از عمل جراحی به دست آمده بودند، توسط روش real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سپس ما با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی تغییرات بیان ژن DPT را در دو کوهورت جداگانه از بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شد. به منظور اطلاع از اثرات بیان سطوح مختلف ژن DPT در میزان بقای بیماران، آنالیز کاپلان-مایر انجام شد. در نهایت آنالیز جامع برای بیان ژن DPT در ۱۶ سرطان مختلف انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تکنیک real-time PCR نشان داد میزان بیان ژن DPT در بافت توموری نسبت به بافت نرمال معده کاهش می‌یابد. همچنین میانگین بیان ژن DPT در مراحل مختلف سرطان معده به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. آنالیز مدت زمان بقای نشان داد که بیان mRNA ژن DPT با بقای کلی بیماران همبستگی مثبت دارد. همچنین ارتباط معنی‌داری میان بیان ژن DPT و اندازه اولیه تومور مشاهده گردید. بررسی بیان این ژن در ۱۶ سرطان مختلف نشان دهنده کاهش بیان آن در بافت توموری نسبت به بافت نرمال مجاور است.

نتیجه‌گیری: این نتایج پیشنهاد می‌کنند که کاهش بیان ژن DPT در بافت معده، احتمالاً نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان معده دارد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، DPT، بیان ژن، متاستاز

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۹/۷؛ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۳/۱۰؛ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۲۰

مقدمه

آدنو کارسینوم های معده از بافت اپیتلیوم منشاء گرفته و بیش از ۹۰ درصد از سرطان های معده از نوع آدنو کارسینوم می باشند. ده درصد باقی مانده یکی از انواع لنفوم غیر هاچکین، لیومیوسارکوما، تومورهای استرومایی و کارسینوئید هستند (۱). آدنو کارسینوم معده از نظر هیستولوژی به دو نوع روده ای و منتشره تقسیم می شوند. مشخصه نوع اول سلول های چسبنده ای هستند که ساختارهای لوله ای شکل غده ای تشکیل می دهند در حالی که نوع دوم باعث افزایش ضخامت دیواره معده بدون توده مجزاست (۲). این سرطان یکی از شایع ترین انواع بدخیمی ها بوده و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان را به خود اختصاص می دهد. هر ساله بیش از یک میلیون بیمار جدید شناسایی شده و نزدیک به ۷۵۰ هزار نفر در اثر این بیماری فوت می کنند (۳). در سال های اخیر اگرچه شیوع و مرگ و میر ناشی از این بیماری کاهش داشته، تعداد بیماران شناسایی شده رو به افزایش بوده است که به علت پیری جمعیت است. کاهش میزان شیوع این سرطان نیز به موازات کاهش شیوع ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری بوده است (۴).

چندین عامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد و گسترش سرطان معده نقش بازی می کند که آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری یکی از شناخته شده ترین فاکتورهای خطر محیطی است (۵). رژیم غذایی نیز نقش مهمی در خطر ابتلا به این سرطان کشنده دارد. فاکتورهای خطر موجود در رژیم غذایی شامل استفاده از غذاهای نمک سود یا دودی شده، مصرف کم میوه و سبزیجات تازه و مصرف غذاهایی با نگهداری نامناسب است (۶). از دیگر عوامل مرتبط با افزایش خطر سرطان معده می توان گاستریت آتروفیک مزمن، گاستروپاتی هیپرتروفیک (بیماری منتریه)، پولیپ معده، وضعیت اجتماعی-اقتصادی پایین، چاقی و گروه خونی A را نام برد (۷).

فاکتورهای ژنتیکی دخیل در سرطان معده شامل جهش های ژنتیکی، تغییرات اپی ژنتیکی، تغییرات ترانسکریپتومی، تغییرات تعداد نسخه ژن ها و تغییرات کروموزومی می باشند (۸، ۹). این فرآیندها باعث تجمع آسیب های ژنتیکی و کسب صفاتی می شوند که در مجموع به عنوان مشخصه سرطان شناخته می شود. از جمله این صفات می توان به بی نیازی به سیگنال های رشد، مقاومت در برابر آپوپتوز، فعال سازی سیستم تهاجم و رگ زایی اشاره کرد (۱۰). مطالعات بر پایه ریز آرایه های ژنومی نشان دادند که سرطان زایی معده در نهایت از مسیرهای انکوژنی مختلفی می شود باعث ایجاد تومورهای معده می شوند و فعالیت این مسیرها پیش آگهی بالینی را پیش بینی می کند (۱۱).

درماتوپونتین (Dermatopontin, DPT) یک پروتئین غنی از تیروزین ماتریکس خارج سلولی هست که وزن ۲۲ کیلو دالتونی دارد (۱۲). این پروتئین اولین بار در پوست گاو شناسایی و مشخص گردید با فاکتور رشد تغییردهنده بتا (Transforming Growth Factor Beta 1, TGFβ1)، فیبرونکتین و دکورین در ارتباط است (۱۳). DPT بر ماتریکس خارج سلولی از طریق توانایی آن در افزایش پلیمریزاسیون فیبرینوژن و کلاژن و از طریق تعاملات آن با دکورین و TGF-β تأثیر می گذارد و در نهایت منجر به افزایش فعالیت بیولوژیکی TGF-β می شود (۱۴). DPT با توجه به نقشی که در اتصال سلول به سلول و توسعه ماتریکس خارج سلولی دارد، چندین فرآیند فیزیولوژیکی مهم را تنظیم می کند (۱۵). مهار DPT با طیفی از بیماری ها از جمله اسکروز سیستمیک، لیومیوم رحم، فیروز پوستی و چندین سرطان همراه است (۱۵). DPT همچنین متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان را مهار می کند، اگرچه مکانیسم این اثرات مشخص نشده است (۱۶).

به نظر می رسد پروتئین های موجود در ماتریکس نقش ساختاری داشته باشند، DPT یکی از پروتئین های غیر کلاژنی ماتریکس خارج سلولی است. موش های دارای نقص در DPT یک فنوتیپ مشابه با سندرم اهلرز-دائلس

گروه های سرطان ممکن است نشان دهد که این ژن ها در بسیاری از مسیرهای بیولوژیکی اصلی دخیل در شکل گیری و پیشرفت سرطان شرکت می کنند. هر چند در برخی از مطالعات قبلی کاهش بیان این ژن در سرطان معده مشاهده شده است (۲۰)؛ اما هنوز اطلاعات دقیقی در رابطه با بیان این ژن در سرطان معده در دسترس نیست. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان ژن DPT در بافت توموری و حاشیه توموری معده و همچنین ارزیابی نقش بیان این ژن به عنوان یک مارکر آگهی دهنده است.

مواد و روش ها

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 نمونه ها 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، آدنو کارسینوم های معده از نوع منتشره بودند که قبل از جراحی تحت شیمی درمانی قرار نگرفته باشند. نمونه ها با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شده و تا انجام آزمایش ها در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA تام طبق پروتکل محلول استخراج RNA (-RNase plus) شرکت سیناژن (ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. قبل از انجام استخراج نمونه های بافتی با استفاده از نیتروژن مایع و هاون به صورت پودر درآمد. RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز (دنا ژن تجهیز، ایران) و دستگاه نانودراپ (Thermo scientific، آمریکا) تحت کنترل کیفی و کمی قرار گرفت و تا مرحله سنتز cDNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. جهت ساخت cDNA

را نشان می دهند که همراه با میکرو فیبریل های کلاژن ضعیف و حساسیت پوستی به تنش های مکانیکی است (۱۷)؛ بنابراین DPT نقش مهمی در حفظ یکپارچگی بافت ها دارد. پیشرفت های اخیر اهمیت تعاملات سلول با ماتریکس خارج سلولی را برجسته کرده است. ماتریکس خارج سلولی یک شبکه پیچیده و کاربردی است که می تواند به طور همزمان با گیرنده های سطح سلولی تعامل داشته باشد. دکورین، یک پروتئو گلیکان کوچک غنی از لوسین و شریک اتصال DPT، باعث جلوگیری از رشد سلول های سرطان سینه شده و مانع از متاستاز آن ها به ریه می شود (۱۶).

درماتوپونتین یک جزء مهم از ماتریکس خارج سلولی است و به نظر می رسد مسئول معماری ماتریکس و تعاملات ماتریکس-سلول باشد. گزارش شده است که DPT از طریق تنظیم تولید فیبرهای کلاژن و فیبرونکتین در تکامل و پیشرفت تومورها نقش دارد. برخی مطالعات نشان داده اند که بیان این پروتئین در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان کاهش می یابد و این کاهش بیان با اتصال و تهاجم سلولی در ارتباط است (۱۶). مطالعه دیگری نشان داد که این پروتئین با غیرفعال سازی مسیر پیام رسانی Wnt تکثیر سلول های سرطانی کبد را متوقف می نماید (۱۸). همچنین مشخص شده است که DPT می تواند مهاجرت و تهاجم سلول های سرطان کبد را از طریق تعامل با پروتئین های اینتگرین مهار کند (۱۸). اکثر مطالعات انجام شده به نقش این پروتئین در متاستاز و تهاجم سلولی تأکید دارند؛ اما مکانیسم جزئی این عمل به روشنی مشخص نشده است (۱۹).

در مطالعه ای که با استفاده از میکرو آرایه به منظور شناسایی الگوی بیان ژن ها در سرطان معده انجام شد مشخص گردید که بیان ژن DPT برخلاف سایر ژن های مورد بررسی، در تمام مراحل و درجات سرطان معده کاهش می یابد. این گروه نتیجه گیری کردند که الگوی بیان ثابت در تمام زیر

میکروولیتسر مسترمیکس Biofact، یک میکروولیتسر از هر کدام از پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب، ۶ میکروولیتسر آب عاری از نوکلئاز و همچنین ۲ میکروولیتسر از cDNA ساخته شده بود. دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. در ادامه ۴۰ چرخه تکثیر شامل دنا تورا سیون در دمای ۹۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و اتصال و طویل سازی در دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در نهایت بررسی منحنی ذوب در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. کمی سازی نسبی بیان ژن ها 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 ژن های انسانی و با استفاده از ابزار Primer BLAST و سایت NCBI انجام گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توالی و ویژگی های پرایمرهای مورد استفاده

اندازه محصول	توالی	پرایمر	ژن
۱۱۲ جفت باز	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	رو به جلو	GAPDH
	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	رو به عقب	
۹۵ جفت باز	GGCAGTTTTACTGTTGTCGCTACA	رو به جلو	DPT
	CATGTCCATTTCCTCACCATAGTG	رو به عقب	

در هر میلیون خوانش (Transcript Per Million, TPM) محاسبه گردید. جهت بررسی همبستگی بیان ژن DPT با دیگر ژن ها، ارتباط بیان این ژن در ۱۶۰ نمونه با سایر ژن ها بررسی گردید. در نهایت ۴ ژن با بیشترین میزان همبستگی مثبت و منفی گزارش شد. همچنین میزان بیان ژن DPT در ۳۵ بافت سالم معده و ۳۶۱ بافت سرطانی معده از پایگاه داده اطلس ژنوم سرطان (The Cancer Genome Atlas, TCGA) بازیابی گردید (۲۴) و میزان بیان این ژن در مراحل مختلف سرطان مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز مدت زمان بقا

از کیت شرکت BIOFACT (کره) استفاده گردید. برای اینکار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با Master Mix، Random Hexamer و الیگو dT مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد (جهت رونویسی معکوس) انکوبه گردید. در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد (جهت غیرفعال شدن آنزیم نسخه بردار معکوس توسط تیمار حرارتی) تیمار شد (ترموسایکلر ABI مدل Veriti، آمریکا). محصول حاصل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

بررسی میزان بیان ژن

سطوح بیان ژن ها با تکنیک qRT-PCR و به وسیله ترموسایکلر StepOnePlus شرکت Applied Biosystems (آمریکا) اندازه گیری شد. حجم نهایی هر کدام از واکنش ها ۲۰ میکروولیتسر بود که شامل ۱۰

داده کاوی (Data Mining) بیوانفورماتیکی بیان ژن

به منظور بررسی بیشتر تغییرات بیان ژن DPT در نمونه های سالم و سرطانی از دو پایگاه داده بیوانفورماتیکی دیگر استفاده شد. در ابتدا خوانش های توالی یابی مربوط به ۸۰ جفت نمونه آدنوکارسینوم معده و بافت سالم مجاور آن از پایگاه داده های بیانی (Gene Expression Omnibus, GEO) بازیابی گردید (۲۱). پس از مراحل کنترل کیفی داده ها و حذف خوانش های بی کیفیت پایین، از نرم افزار Hisat2 جهت مکان یابی این خوانش ها بر روی ژنوم مرجع استفاده گردید (۲۲). جهت تخمین دقیق تر میزان بیان ژن، خوانش های دوتایی با استفاده از نرم افزار MarkDuplicate حذف شدند (۲۳). در نهایت میزان بیان ژن DPT در هر کدام از نمونه ها بر حسب تعداد نسخه

آنالیز آماری

جهت بررسی آماری داده ها از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد. برای تعیین معنی دار بودن تغییرات بیان ژن از آزمون آماری T جفت شده برای نمونه های توموری و سالم به دست آمده از یک بیمار و از آزمون آماری T جفت نشده برای نمونه های توموری و سالم بیماران مختلف استفاده گردید. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن DPT با ویژگی های دموگرافیک و پاتولوژیکی بیماران از آزمون Chi-Square استفاده شد. همچنین برای تعیین معنی دار بودن تفاوت مدت زمان بقا در بیماران با بیان بالا و پایین ژن DPT از آزمون Mantel-Cox استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط بیان بین ژن DPT با ژن های دیگر از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. در تمامی موارد $P < 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

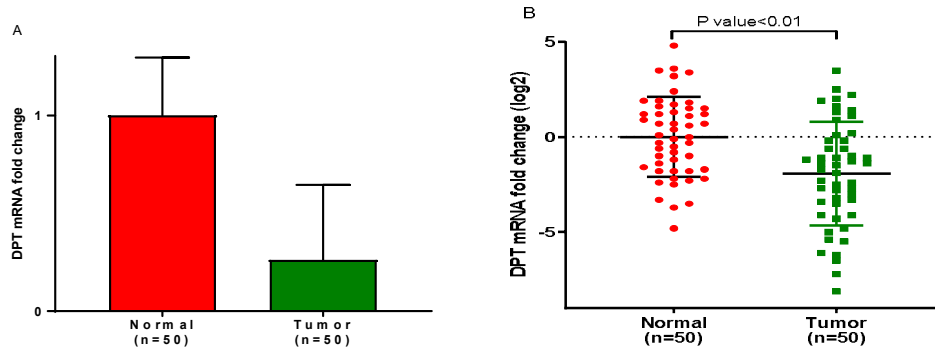
یافته ها

مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن DPT در نمونه های تومور معده نسبتاً به بافت حاشیه تومور به میزان یک چهارم کاهش بیان دارد (شکل ۱- A). بررسی آماری این تغییرات نشان داد این میزان کاهش بیان از لحاظ آماری معنی داری ($P < 0.01$) است (شکل ۱- B). همین یافته در آنالیز نتایج توالی یابی کل ترانسکریپوم نیز تکرار شد و مشخص گردید در تمامی مراحل سرطان معده میزان بیان ژن DPT نسبت به بافت سالم کاهش معنی داری دارد (شکل ۲). همچنین آنالیز نتایج RNA-seq در ۸۰ جفت نمونه بیماران مبتلا به سرطان معده نشان داد که بیان این ژن در نمونه های توموری کاهش چشمگیری ($P < 0.001$) نسبت به نمونه های بافت سالم مجاور دارد (شکل ۳).

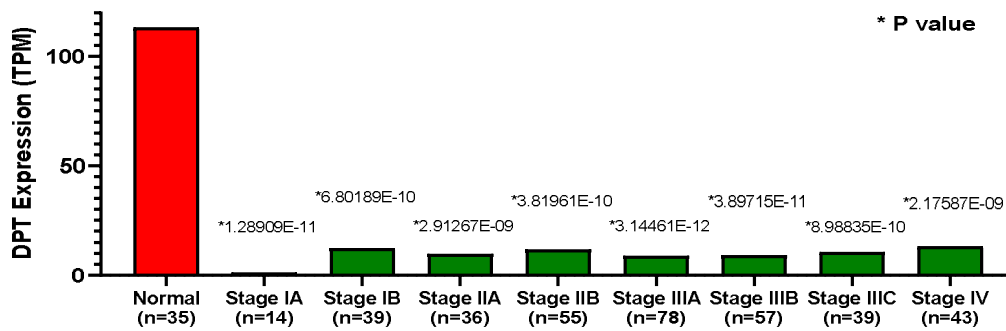
با توجه به گذشت مدت زمان محدود از نمونه گیری های بالینی، امکان انجام آنالیزهای بقا بر روی این بیماران وجود نداشت. به همین منظور اطلاعات میزان بیان ژن DPT و مدت زمان بقا بیماران مبتلا به سرطان معده مربوط به مطالعه های GSE14210، GSE15459، GSE29272، GSE51105 و GSE22377 از پایگاه داده کاپلان-مایر دریافت گردید (۲۵) و بر اساس این اطلاعات منحنی های مختلف مدت زمان بقا برای بیماران رسم شد. این مطالعات در مجموع شامل اطلاعات بیان ژن و مدت زمان بقا ۵۹۲ بیمار مبتلا به سرطان معده می باشند. این بیماران بر اساس میانه بیان ژن DPT در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم بندی شده و مدت زمان بقا آن ها سنجیده و مقایسه شد.

بررسی بیان ژن در بین سرطان ها (Pan-cancer)

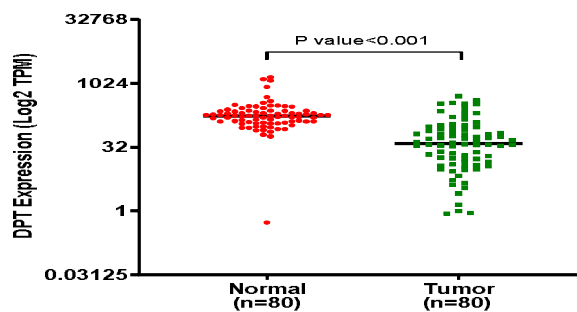
به منظور بررسی تغییرات بیان ژن DPT در سرطان های مختلف داده های مربوط به اطلس ژنوم سرطان (TCGA) بازیابی گردید. سرطان هایی که تعداد نمونه آن ها در هر کدام از گروه های سالم و سرطانی کمتر از ۱۰ نمونه بود از آنالیز کنار گذاشته شد. در نهایت تغییرات بیان ژن DPT در کارسینوم اوروتلیال مثانه (BLCA)، کارسینوم تهاجمی پستان (BRCA)، آدنوکارسینوم کولون (COAD)، کارسینوم مری (ESCA)، کارسینوم سلول اسکواموس سر و گردن (HNSC)، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه (KICH)، کارسینوم سلول رنال کلیه (KIRC)، کارسینوم سلول پایلاری کلیه (KIRP)، کارسینوم هیپاتوسلولار کبد (LIHC)، آدنوکارسینوم ریه (LUAD)، کارسینوم سلول اسکواموس ریه (LUSC)، آدنوکارسینوم پروستات (PRAD)، آدنوکارسینوم رکتال (READ)، کارسینوم تیروئید (THCA)، آدنوکارسینوم معده (STAD) و کارسینوم اندومتريال رحم (UCEC) بررسی شد.



شکل ۱. تغییرات بیان ژن DPT در نمونه های بالینی بیماران مبتلا به سرطان معده. میزان بیان این ژن در نمونه های تومور ۲۶٪. نمونه های حاشیه تومور است (A)، آزمون آماری T جفت شده نشان از کاهش معنی دار ($P < 0.01$) بیان ژن در نمونه های توموری دارد (B).

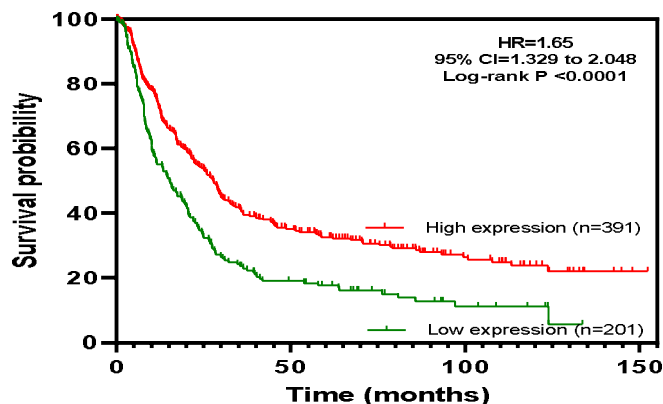


شکل ۲. بیان ژن DPT در مراحل مختلف سرطان معده. بررسی بیان این ژن با استفاده از آزمون آماری T جفت نشده در تمامی مراحل سرطان معده نسبت به بافت حاشیه تومور کاهش معنی داری ($P < 0.05$) را نشان می دهد.



شکل ۳. بیان ژن DPT در بافت های سالم و سرطانی 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 کاهش چشمگیری نشان داد. بررسی با استفاده از آزمون آماری T جفت شده کاهش معنی داری ($P < 0.01$) را نشان می دهد.

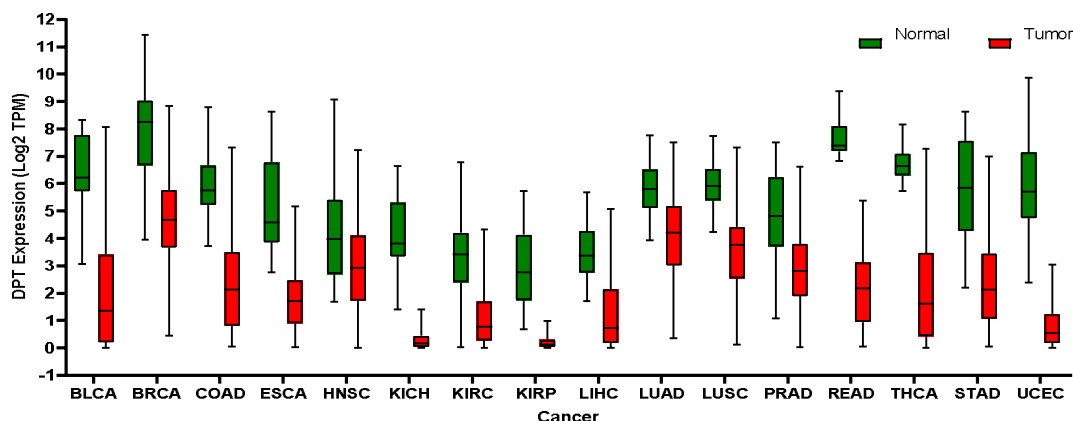
آنالیز کاپلان-مایر به منظور بررسی ارتباط بیان ژن DPT با طول عمر بیماران مبتلا به سرطان معده انجام گردید و مشخص شد بیمارانی که در گروه بیان بالاتر ژن قرار دارند احتمال بقاء بیشتری نسبت به بیماران گروه بیان پایین دارند ($P < 0.001$). میانگین مدت زمان بقاء کلی در بیماران گروه بیان بالا ۲۸ ماه و در بیماران گروه بیان پایین ۱۵ ماه بود (شکل ۴).



شکل ۴. احتمال بقای بیماران مبتلا به سرطان معده در دو گروه بیان بالا و پایین ژن DPT. بقای کلی بیماران با بیان بالای ژن DPT نسبت به بیماران با بیان پایین این ژن بالاتر است. با استفاده از آزمون Mantel-Cox مشخص گردید اختلاف بین دو گروه از لحاظ آماری نیز معنی دار ($P < 0.0001$) است.

کارسینوم سلول اسکواموس سر و گردن، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه، کارسینوم سلول رنال کلیه، کارسینوم سلول پایپلاری کلیه، کارسینوم هیاتوسلولار کبد، آدنوکارسینوم ریه، کارسینوم سلول اسکواموس ریه، آدنوکارسینوم پروستات، آدنوکارسینوم رکتال، کارسینوم تیروئید، آدنوکارسینوم معده و کارسینوم اندومترال رحم ژن DPT به صورت کاهشی تنظیم می گردد.

با توجه به کاهش بیان این ژن در چندین کوهورت بیماران مبتلا به سرطان معده و برای به دست آوردن دیدگاه کلی در رابطه با تغییرات بیان ژن DPT در سرطان‌های مختلف، آنالیز بین سرطانی انجام شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، مشخص گردید در تمامی موارد بررسی شده شامل؛ کارسینوم اوروتلیال مثانه، کارسینوم تهاجمی پستان، آدنوکارسینوم کولون، کارسینوم مری،



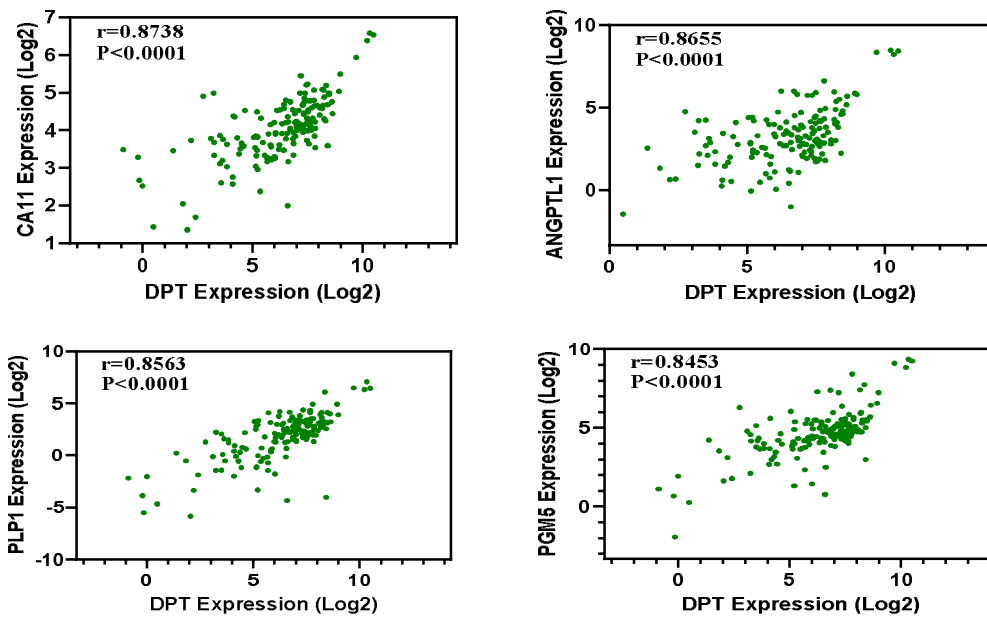
شکل ۵. تغییرات بیان ژن DPT در سرطان‌های مختلف نسبت به بافت‌های سالم. میزان بیان این ژن در تمامی سرطان‌های مورد بررسی به صورت کاهشی تنظیم شده است.

ما نشان داد که چهار ژن PLP1، ANGPTL1، CA11 و PGM5 به ترتیب بیشترین همبستگی مثبت بیان را با ژن

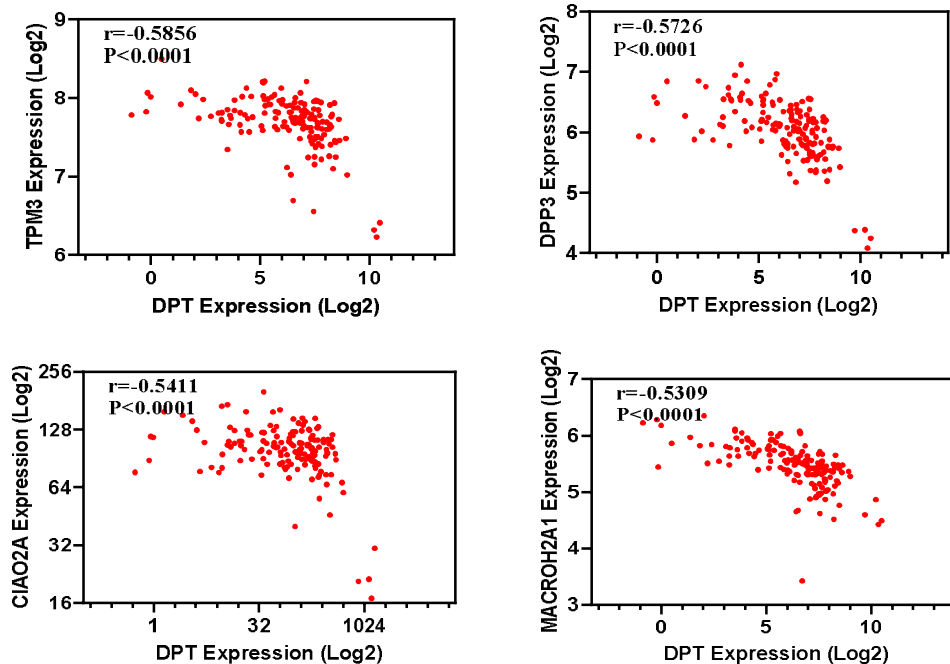
برای بررسی هم‌بیانی مثبت و منفی ژن DPT با ژن‌های دیگر همبستگی بین بیان آن‌ها بررسی گردید. نتایج مطالعه

بالاترین همبستگی منفی بیان را با ژن DPT نشان دادند (شکل ۷).

DPT دارند (شکل ۶)، در مقابل ژن‌های TPM3، CIAO2A، DPP3 و MACROH2A1 به ترتیب



شکل ۶ همبستگی مثبت بیان ژن DPT با ژن‌های دیگر. ژن‌های CA11، ANGPTL1، PLP1 و PGM5 به ترتیب بیشترین همبستگی مثبت بیان را با ژن DPT نشان دادند. جهت بررسی همبستگی از تحلیل همبستگی پیرسون استفاده گردید.



شکل ۷. همبستگی منفی بیان ژن DPT با ژن‌های دیگر. ژن‌های TPM3، DPP3، CIAO2A و MACROH2A1 به ترتیب بیشترین همبستگی منفی بیان را با ژن DPT نشان دادند. جهت بررسی همبستگی از تحلیل همبستگی پیرسون استفاده گردید.

بررسی اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی ارتباطی بین میزان بیان نشان نداد. در مقابل مشخص گردید که بیان کم تر ژن DPT و فاکتورهای مانند سن، جنس، استعمال الکل و مواد مخدر، محل اولیه تومور، سطح تمایز تومور و متاستاز (جدول ۲).

جدول ۲. همبستگی میزان بیان ژن DPT با متغیرهای دموگرافیک و پاتولوژیکی بیماران

مقدار P	بیان DPT		متغیر
	پایین	بالا	
۰/۵۷۱۳	۱۴	۱۲	سن بالای ۶۳ سال
	۱۱	۱۳	زیر ۶۳ سال
۰/۰۷۷۱	۱۹	۱۳	جنس مرد
	۶	۱۲	زن
۰/۲۰۷۷	۲۰	۱۶	استعمال سیگار ندارد
	۵	۹	دارد
۰/۹۹۹۹	۲۳	۲۳	استعمال الکل ندارد
	۲	۲	دارد
۰/۳۸۵۱	۲۳	۲۱	استعمال مواد مخدر ندارد
	۲	۴	دارد
۰/۲۶۹۵	۱۹	۲۲	متاستاز ندارد
	۶	۳	دارد
۰/۶۰۷۷	۹	۷	محل تومور اولیه آتروم
	۹	۷	بدنه معده
	۴	۸	کاردیا
	۳	۳	فوندوس
۰/۹۲۹۳	۵	۴	سطح تمایز خوب
	۶	۵	متوسط
	۷	۹	ضعیف
	۷	۷	بدون تمایز
۰/۰۴۷۰	۱۷	۱۰	اندازه تومور اولیه بیشتر از ۵/۸ سانتی متر
	۸	۱۵	کمتر از ۵/۸ سانتی متر

استفاده از ژن‌های مهارکننده تومور و متاستاز به عنوان درمان‌های ضد سرطان است و این نوع تحقیقات در مطالعات بالینی و تجربی در حال انجام است (۲۶،۲۷).

بحث

در سال‌های اخیر افزایش فهم مولکولی از پاتوژنز سرطان منجر به ارائه راهکارهای درمانی جدیدی برای مواجهه با انواع سرطان شده است. یکی از دیدگاه‌های نسبتاً جدید

هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات و نقش بیان ژن DPT در سرطان معده بود.

ژن DPT متعلق به گروهی از ژن‌ها با عنوان ژن‌های مهارکننده متاستاز بوده و در بافت‌های مختلفی بیان می‌شود. این ژن دارای نقش‌هایی متعددی از جمله اتصالات و مهاجرت سلولی، تنظیم تکثیر سلولی و نقش در آپوپتوز است (۱۳، ۲۸، ۲۹). از این رو، ارتباط عدم تنظیم بیان این ژن با مختل شدن عملکرد سلولی و بیماری‌زایی منطقی به نظر می‌آید. مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن DPT در نمونه‌های تومور معده نسبت به بافت حاشیه تومور و همچنین در آنالیزهای بیوانفورماتیکی کاهش چشمگیری دارد. همچنین مشخص گردید این ژن در تمام مراحل سرطان معده به صورت کاهش تنظیم می‌گردد.

همراستا با نتایج ما، لی و همکارانش گزارش نمودند که بیان این ژن در بافت کارسینوم هپاتوسلولار نسبت به بافت سال مجاور کمتر است (۳۰). همچنین گوو و همکارانش نشان دادند بیان DPT در طی سرطان پاپیلاری تیروئید به صورت کاهش تنظیم می‌شود (۱۹). بررسی بیان ژن DPT در سرطان اندومتر نشان داد که بیان این ژن به طور چشمگیری در بافت سرطانی کاهش می‌یابد (۳۱). در یک مطالعه دیگر بیان ژن و پروتئین DPT در سلول‌های سرطانی کارسینوم دهان کاهش قابل توجهی نسبت به سلول‌های نرمال داشت. در همین رده سلولی افزایش و بیان دوباره DPT باعث افزایش چسبندگی و کاهش تهاجم سلولی گردید (۱۶).

ژن‌های گروه مهارکننده متاستاز، بر خلاف ژن‌های مهارکننده تومور دچار جهش نمی‌شوند بلکه در اکثر سرطان‌ها به صورت کاهش تنظیم می‌شوند (۳۲). نتیجه آنالیز بین سرطانی ما نیز نشان داد که بیان ژن DPT در همه سرطان‌های مورد بررسی به صورت کاهش تنظیم می‌گردد. با توجه به این موضوعات می‌توان فرض نمود در صورت بازگشت بیان این ژن‌ها (re-expression) رشد و تهاجم تومور متوقف خواهد شد. در همین راستا مشخص

شده است که افزایش بیان DPT باعث مهار تکثیر سلولی و کاهش رشد کارسینوم هپاتوسلولار می‌شود (۱۸)؛ بنابراین ژن درمانی DPT می‌تواند به عنوان یک درمان مکمل در سرطان‌های بدخیم مدنظر باشد.

مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA و اصلاح هیستون‌ها اصلی‌ترین عوامل تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها می‌باشند (۳۳). فو و همکارانش به منظور بررسی نقش هر کدام از این فرایندها در تغییر بیان ژن DPT از دو عامل دمتیلاسیون و مهارکننده داستیلاز در رده‌های سلولی سرطانی و نرمال استفاده کردند. نتایج این گروه نشان داد که بیان کاهش یافته ژن DPT در سلول‌های سرطانی در اثر تیمار با عامل دمتیلاسیون (۵-آزا-۲-دئوکسی سیتیدین) به سطح طبیعی بر می‌گردد، در حالی که عامل داستیل‌کننده تاثیری در بیان ژن نداشت. جالب تر آنکه عامل دمتیلاسیون نقشی در بیان ژن در سلول‌های نرمال نشان نداد (۳۴). بررسی ساختار ژنومی DPT وجود یک جزیره CpG را در ناحیه پرموتور این ژن تأیید کرده است. با توجه به این موارد به نظر می‌رسد در سلول‌های سرطانی متیلاسیون ناحیه پرموتور عامل اصلی کاهش بیان ژن DPT باشد (۳۰، ۳۴).

نتایج آنالیز کاپلان-مایر نشان داد بیمارانی که بیان بالاتر ژن DPT را دارند به وضوح بقاء کلی بیشتری دارند. یافته مشابهی در مورد ارتباط طول عمر بیماران مبتلا به کارسینوم هپاتوسلولار و بیان این ژن گزارش شده است (۱۸). در مجموع این یافته‌های نشان می‌دهند که تنظیم کاهش بیان ژن DPT در برخی سرطان‌ها با پیش‌آگهی بد همراه است.

بررسی اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی ارتباطی بین میزان بیان ژن DPT و فاکتورهایی مانند سن، جنس، استعمال الکل و مواد مخدر، محل اولیه تومور، سطح تمایز تومور و متاستاز سرطان معده نشان نداد. در مقابل مشخص گردید که بیان کم تر ژن DPT با اندازه بزرگ تر تومور در ارتباط است. در یک مطالعه دیگر که بر روی سرطان کارسینوم دهان انجام گردید، بیان پایین این ژن با متاستاز به گره‌های لنفاوی

ژن‌درمانی DPT و بازگشت بیان آن می‌تواند به عنوان یکی از گزینه‌های درمانی سرطان معده در کنار سایر روش‌های درمانی در نظر باشد.

در ارتباط بود (۱۶). همچنین مشخص شده است که کاهش بیان DPT با تمایز کمتر، عمق تهاجم و درجه تومور بیشتر در سرطان اندومتر مرتبط است (۳۱).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارتش جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد. هیچ‌کدام از نویسندگان این مقاله تعارض منافی برای انتشار آن ندارند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن DPT در سرطان معده به صورت کاهشی تنظیم می‌شود و این کاهش بیان با طول عمر بیماران در ارتباط است. با توجه این یافته‌ها حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بیان ژن DPT به عنوان یک مارکر پیش‌آگهی در سرطان معده استفاده مطرح است و

References

1. Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):264-79.
2. Garcia Pelaez J, Barbosa Matos R, Gullo I, Carneiro F, Oliveira C. Histological and mutational profile of diffuse gastric cancer: current knowledge and future challenges. *Molecular oncology*. 2021;15(11):2841-67.
3. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(11):4012.
4. Grabsch HI, Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Digestive surgery*. 2013;30(2):150-8.
5. Díaz P, Valenzuela Valderrama M, Bravo J, Quest AF. Helicobacter pylori and gastric cancer: adaptive cellular mechanisms involved in disease progression. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:5.
6. Bouras E, Tsilidis KK, Triggi M, Siargkas A, Chourdakis M, Haidich A-B. Diet and Risk of Gastric Cancer: An Umbrella Review. *Nutrients*. 2022;14(9):1764.
7. Marimuthu A, Jacob HK, Jakharia A, Subbannayya Y, Keerthikumar S, Kashyap MK, et al. Gene expression profiling of gastric cancer. *Journal of proteomics & bioinformatics*. 2011;4(4):74.
8. Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarizadeh MR, Mahmoodzadeh H. ADAR expression and copy number variation in patients with advanced gastric cancer. *BMC gastroenterology*. 2020;20(1):1-9.
9. Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarizadeh MR, Mahmoodzadeh H. Genome-Wide Characterization of RNA Editing Sites in Primary Gastric Adenocarcinoma through RNA-Seq Data Analysis. *International Journal of Genomics*. 2020;2020.
10. Tan IB, Ng I, Tai WM, Tan P. Understanding the genetic basis of gastric cancer: recent advances. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2012;6(3):335-41.
11. Ooi CH, Ivanova T, Wu J, Lee M, Tan IB, Tao J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS genetics*. 2009;5(10):e1000676.
12. Krishnaswamy VR, Korrapati PS. Role of dermatopontin in re-epithelialization: implications on keratinocyte migration and proliferation. *Scientific reports*. 2014;4(1):1-6.

13. Okamoto O, Fujiwara S. Dermatopontin, a novel player in the biology of the extracellular matrix. *Connective tissue research*. 2006;47(4):177-89.
14. Takeda U, Utani A, Wu J, Shinkai H, Adachi E, Koseki H, et al. Targeted disruption of dermatopontin causes abnormal collagen fibrillogenesis. *Journal of investigative dermatology*. 2002;119(3):678-83.
15. Sidgwick G, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(2):141-52.
16. Yamatoji M, Kasamatsu A, Kouzu Y, Koike H, Sakamoto Y, Ogawara K, et al. Dermatopontin: a potential predictor for metastasis of human oral cancer. *International journal of cancer*. 2012;130(12):2903-11.
17. Takeda U, Utani A, Wu J, Adachi E, Koseki H, Taniguchi M, et al. Targeted disruption of dermatopontin causes abnormal collagen fibrillogenesis. *J Invest Dermatol*. 2002;119(3):678-83.
18. Liu S, Qiu J, He G, Geng C, He W, Liu C, et al. Dermatopontin inhibits WNT signaling pathway via CXXC finger protein 4 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer*. 2020;11(21):6288.
19. Guo Y, Li H, Guan H, Ke W, Liang W, Xiao H, et al. Dermatopontin inhibits papillary thyroid cancer cell proliferation through MYC repression. *Molecular and cellular endocrinology*. 2019;480:122-32.
20. Cui J, Li F, Wang G, Fang X, Puett JD, Xu Y. Gene-expression signatures can distinguish gastric cancer grades and stages. *PloS one*. 2011;6(3):e17819.
21. Clough E, Barrett T. The gene expression omnibus database. *Statistical genomics*: Springer; 2016. p. 93-110.
22. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*. 2015;12(4):357.
23. 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(7):239.
24. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology*. 2015;19(1A):A68.
25. Szász AM, Lánckzy 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(31):49322.
26. Morris LG, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*. 2015;121(9):1357-68.
27. Liu Y, Wu W, Yiyao W, Han S-S, Yuan Y, Huang J, et al. Recent development of gene therapy for pancreatic cancer using the non-viral nanovectors. *Biomaterials Science*. 2021.
28. Liu X, Meng L, Shi Q, Liu S, Cui C, Hu S, et al. Dermatopontin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro. *Matrix Biology*. 2013;32(1):23-31.
29. Lu B, Mahmud H, Maass AH, Yu B, van Gilst WH, de Boer RA, et al. The Plk1 inhibitor BI 2536 temporarily arrests primary cardiac fibroblasts in mitosis and generates aneuploidy in vitro. *PloS one*. 2010;5(9):e12963.
30. Li X, Feng P, Ou J, Luo Z, Dai P, Wei D, et al. Dermatopontin is expressed in human liver and is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(9):979-85.
31. Huang H, Hao Z, Long L, Yin Z, Wu C, Zhou X, et al. Dermatopontin as a potential pathogenic factor in endometrial cancer. *Oncology Letters*. 2021;21(5):1-8.

- 32.Khan I, Steeg PS. Metastasis suppressors: functional pathways. *Laboratory investigation*. 2018;98(2):198-210.
- 33.Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(10):726-34.
- 34.Fu Y, Feng M-X, Yu J, Ma M-Z, Liu X-J, Li J, et al. DNA methylation-mediated silencing of matricellular protein dermatopontin promotes hepatocellular carcinoma metastasis by $\alpha3\beta1$ integrin-Rho GTPase signaling. *Oncotarget*. 2014;5(16):6701.