

Changes in BTG1 Gene Expression Level in People with Gastric Cancer and Its Comparison with Healthy People

Hamid Ali-Bahar¹, Yousef Paridar²,
Maysam Mard-soltani³, Reza Haji Hosseini^{4*}

1. Ph. D., Department of Biochemistry, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Gastroenterology Clinic, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran

3. Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran

4. Professor, Department of Biochemistry, Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran

(Received: May 08, 2021 - Accepted: Jun. 15, 2021)

تغییرات سطح بیان ژن BTG1 در افراد مبتلا به سرطان معده و مقایسه آن با افراد سالم

حمید علی بهار^۱، یوسف پریدار^۲، میثم مردسلطانی^۳،

رضا حاجی حسینی^{۴*}

۱. دکتری، گروه بیوشیمی، پیام نور، تهران، ایران

۲. استادیار، کلینیک ویژه بیماری‌های گوارش و کبد بالغین، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۳. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۴. استاد، گروه بیوشیمی، پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۵)

Abstract

Gastric cancer (GC) is one of the most common types of cancer and the second leading cause of cancer mortality. Delay in diagnosis and lack of screening are the main causes of high mortality from this disease. Finding an accurate and effective diagnostic biomarker seems to be essential for effective treatment of GC. In this regard, using a gastroscope, we collected tissue samples from patients with GC and healthy individuals. The obtained samples were used to extract their RNA using Trizol solution kit. RNA samples were used for qRT-PCR using specific primers designed for BTG1 and GAPDH genes. QRT-PCR results were analyzed using $2^{-\Delta Ct}$ method and various statistical tests using SPSS software. In total, 40 samples of GC and healthy controls were collected and their demographic information was recorded. RNA extraction produced the amount of RNA required for qRT-PCR. The qRT-PCR results showed that BTG1 expression was significantly decreased in GC samples. According to the obtained results, it can be concluded that the reduction of BTG1 expression can act as an accurate biomarker for GC. This gene can also be an indicator of GC pathogenicity. These results could indicate possible diagnostic and therapeutic applications of BTG1 for GC.

Keywords: BTG1, gastric cancer, biomarkers, diagnosis

چکیده

سرطان معده (GC) یکی از متداول‌ترین انواع سرطان و دومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است. تأخیر در تشخیص و عدم غربالگری از دلایل اصلی مرگ‌ومیر بالا در اثر این بیماری است. به نظر می‌رسد یافتن یک نشانگر زیستی تشخیصی دقیق و مؤثر برای درمان مؤثر GC ضروری است. در این راستا با استفاده از گاستروسکوپ، ما نمونه‌های بافتی را از بیماران مبتلا به GC و افراد سالم جمع‌آوری کردیم. از نمونه‌های به‌دست‌آمده برای استخراج RNA آنها با استفاده از کیت محلول Trizol استفاده شد. از نمونه‌های RNA برای انجام qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ژن‌های BTG1 و GAPDH استفاده شد. نتایج qRT-PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta Ct}$ و آزمون‌های آماری مختلف از طریق نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مجموع، ۴۰ نمونه از GC و شاهد سالم جمع‌آوری شد و اطلاعات دموگرافیک آنها ثبت شد. استخراج RNA مقدار RNA لازم را برای qRT-PCR تولید کرده بود. نتایج qRT-PCR نشان داد، که بیان BTG1 به‌طور قابل‌توجهی در نمونه‌های GC کاهش یافته است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که کاهش بیان BTG1 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی دقیق برای GC عمل کند. این ژن همچنین می‌تواند شاخص بیماری‌زایی GC باشد. این نتایج می‌تواند کاربردهای تشخیصی و درمانی احتمالی BTG1 برای GC را نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، سرطان معده، نشانگرزیستی، BTG1.

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) مرگ‌ومیر سالانه بیماران سرطانی بیش از ۷/۶ میلیون نفر است (Bray, 2018). سرطان معده، پنجمین سرطان شایع و دومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است که سالانه بیش از ۱۰ هزار مورد جدید سرطان معده در ایران رخ می‌دهد (Fonseca-Camarillo et al., 2021). سالانه بیش از ۷۴۰,۰۰۰ مرگ به GC^۱ نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، تخمین زده می‌شود که سالانه یک میلیون مورد جدید در سراسر جهان تشخیص داده می‌شود (Sung et al., 2021). میزان بالای مرگ‌ومیر در سرطان معده بدلیل تشخیص دیرهنگام و عدم غربالگری کارآمد آن است (Song et al., 2018). از آنجا که مراحل اولیه GC فاقد هرگونه تظاهرات بالینی خاصی است، کنترل و درمان این بدخیمی در مراحل اولیه اغلب بسیار دشوار است (Strand et al., 2017). مطالعات نشان داده است که اگر GC در مراحل اولیه با آزمایشات غربالگری تشخیص داده شود، احتمال زنده ماندن پس از ۵ سال می‌تواند در حدود ۹۰ درصد باشد (Strand et al., 2017).

از آنجا که گزینه‌های درمانی برای بیماران GC محدود به روش‌هایی مانند جراحی و شیمی درمانی است، شناسایی نشانگرهای زیستی برای GC و اهداف ژنی ممکن است میزان بقا و کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشد (Sullivan et al., 2019). بنابراین، درک ژن‌های مسئول سرطان‌زایی معده و مکانیسم مولکولی عملکردهای آنها ضروری است (Jie et al., 2020). به‌تازگی، تعداد زیادی از پروتئین‌های هدف به‌عنوان نشانگرهای زیستی سرطانی مفید شناخته شده‌اند (Zhang et al., 2017). این نشانگرهای زیستی پیامدهای بالقوه‌ای در بهبود تشخیص، پیش‌آگهی و داروهای پیشگیری دارند.

مطالعات نشان داده‌اند که در میان این نشانگرهای زیستی، پروتئین BTG1^۲ کاربرد بالینی امیدوارکننده‌ای دارد. خانواده BTG1 می‌تواند مهاجرت، تهاجم و رشد سلول را تنظیم کند. آنها همچنین می‌توانند تمایز و بلوغ سلول را تحریک کنند، و از آپوپتوز سلول جلوگیری کنند (Fonseca-Camarillo et al., 2021). این خانواده ژنی از ۲۰ عضو تشکیل شده است. BTG1 یک ژن بسیار تنظیم شده است که در درجه اول تکثیر و تمایز سلول را تنظیم می‌کند (Zhang et al., 2017). این ژن یک ژن بازدارنده تومور است که برای اولین بار در لوسمی لنفوسیتی سلول B مزمن کشف شد (Winkler et al., 2010). این ژن شریک انتقال ژن MyoD^۳ است و از این رو، BTG1 نامیده می‌شود (Yufang Huang et al., 2017). BTG1 هنگام ورود سلول‌ها به چرخه تکثیر تنظیم می‌شود (Kim et al., 2020). سطح بیان BTG1 در مراحل مختلف پیشرفت چرخه سلولی متفاوت است (Sasajima, 2002). تولید BTG1 در انتقال فاز G0/G1 از چرخه سلول انجام می‌شود (Schmittgen et al., 2008). با پیشرفت سلول‌ها در فاز G1، BTG1 از تکثیر چندین رده سلول جلوگیری می‌کند (Livak et al., 2001). بنابراین اعتقاد بر این است که این پروتئین عضوی از یک خانواده ضد تکثیر است (Rouault et al., 1992).

چندین مطالعه نشان داده است که بیان BTG1 در تومورهای مختلف از جمله سرطان کبد (Busson et al., 2005)، سرطان پستان (Kim, 2020)، سرطان ریه و سرطان تخمدان کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده‌اند که این کاهش بیان می‌تواند با رشد، تهاجم و متاستاز تومورها ارتباط تنگاتنگی داشته باشد (Kuo et al., 2003). این مشاهدات به‌طور مداوم نشان می‌دهد که بیان بیش از

۲. BTG1: انتقال‌دهنده لنفوسیت B1

۳. MyoD: عنوان شاخص فعال‌سازی سلول‌هاست.

۱. GC: سرطان معده

داشتن معیارهای ورود و خروج این تعداد را حتی بیشتر کاهش می‌دهد. بنابراین، از روش سرشماری برای تعیین حجم نمونه استفاده شد. در این روش، کلیه بیماران سرطانی برای نمونه‌گیری مورد معاینه قرار گرفتند، مشروط بر اینکه آنها معیارهای ورود به سیستم را داشته باشند و فاقد معیارهای خروج باشند. طبق قضیه حد مرکزی، حداقل تعداد نمونه‌ها در هر گروه باید ۲۰ نفر باشد تا یک توزیع طبیعی حفظ شود. این مطالعه مقطعی (توصیفی - تحلیلی) بر روی بیمارانی که در دوره‌ای از سال‌های ۲۰۲۰-۲۰۱۸ به کلینیک تخصصی در دزفول ارجاع شده بودند، انجام شد. افراد براساس معیارهای ورود و خروج تعریف شده انتخاب شدند. داده‌ها به روش میدانی و از طریق چک لیست با استفاده از سوابق بیماران جمع‌آوری شد. این چک لیست شامل سن، جنس، متاستازهای غدد لنفاوی، عفونت H. پیلوری و تمایز بافت شناختی است. داده‌های خام پس از ثبت در چک لیست وارد نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ شدند. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آمار توصیفی (میانگین، انحراف معیار، تعداد و درصد) ارائه شد.

نمونه‌گیری با روش آندوسکوپی

برای انجام آندوسکوپی معمولی دستگاه گوارش فوقانی، از گاستروسکوپ تصویری استاندارد (ویدئوگاستروسکوپ درمانی، Olympus GIF-Q160، شرکت Olympus Optical، توکیو، ژاپن) استفاده شد. نمونه‌های بیوپسی توسط یک متخصص گوارش با استفاده از روش مرجع (Schmittgen *et al.*, 2008) و با استفاده از پنس مخصوص و استاندارد به‌دست آمد. چندین نمونه بافت (۲،۵ میلی مترمربع) از تومور و حاشیه تومور برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر در گروه GC برداشته شد. در گروه کنترل، نمونه‌برداری از بافت معده به ظاهر سالم به‌دست آمد.

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت حاوی محلول

حد BTG1 می‌تواند ازدیاد تومور، مهاجرت و حمله را کاهش دهد (Malekzadeh *et al.*, 2009). علاوه بر این، بیان بیش از حد BTG1 ممکن است به پیش‌آگهی بهتر بیماری کمک کند. BTG1 می‌تواند به‌عنوان یک ژن مهارکننده تومور عمل کند (Winkler *et al.*, 2010; Sasajima *et al.*, 2002). اگر چه ارتباط بین BTG1 و ویژگی‌های بالینی و عوامل پیش‌آگهی سرطان‌های مختلف قبلاً بررسی شده است، اما هنوز این ارتباط بالقوه برای GC مشخص نشده است.

در مطالعه حاضر، سطح بیان BTG1 در بیماران GC مورد بررسی قرار گرفت تا یک نشانگر زیستی جدید برای تشخیص زودهنگام و پیش‌آگهی GC پیدا شود. برای این منظور، نمونه‌های بافتی از افراد سالم و بیماران GC برای یافتن ارتباط احتمالی سطح بیان BTG1 و ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیک GC مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا برای تجزیه و تحلیل سطح بیان BTG1 از روش‌های مختلف مولکولی از جمله qRT-PCR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

ملاحظات اخلاقی

انجام این مطالعه با پایبندی به اصول و دستورالعمل بیانیه هلسینکی انجام گرفت. کلیه مراحل مطابق با رهنمودهای اخلاقی دانشگاه پیام نور تهران انجام شد. کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه توضیحات کامل مطالعه را دریافت کرده و قبل از ورود به مطالعه رضایت کتبی آگاهانه از آنها دریافت کردند. مطالعه تحت کد اخلاق به شماره IR.PNU.REC.1398.057 انجام گرفت.

اندازه نمونه و معیارهای ورود و خروج

گروه GC و گروه کنترل از نظر مشخصات دموگرافیک دارای بالاترین شباهت و همگنی بودند. بر اساس داده‌های مطالعات قبلی در مناطق دیگر، تعداد افراد مبتلا به GC در دزفول محدود است و

PCR در زمان واقعی درحجم واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای شناسایی محصولات حاصل از واکنش PCR از روش استاندارد رنگ SYBR green استفاده شد. برای انجام واکنش در لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری از کیت Ampliqon (دانمارک، SYBR green Master Mix) حاوی SYBR green استفاده شد. اجزای موردنیاز برای واکنش PCR در زمان واقعی استفاده شد. محلول واکنش موردنیاز برای همه نمونه‌ها تهیه شد. سپس، محلول موردنیاز برای هر نمونه (۲ تکرار) در یک لوله ۰/۲ میلی‌لیتری پیپت شد. برای هر واکنش، یک میکرولیتر از هر آغازگر به محلول اضافه شد، کاملاً مخلوط شد و به‌طور مساوی بین دو میکرو لوله توزیع شد. این اقدام تأثیر خطاهای نمونه‌برداری بر نتایج واکنش را به حداقل می‌رساند. پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها در دستگاه Real Time PCR قرار گرفتند (آلمان، سیستم LightCycler® (Roche Life Science) 96). برای اندازه‌گیری تکثیر محصول PCR، نور سبز (۴۷۰ نانومتر) تابیده شد و سیگنال فلورسنت ساطع‌شده در ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از صحت و اختصاصی بودن محصولات تکثیرشده در PCR Real-time، منحنی‌های ذوب محصولات با استفاده از نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR ترسیم شدند. وجود تنها یک منحنی با اوج تیز نشان‌دهنده وجود تنها یک محصول اختصاصی می‌باشد. سطح بیان نسبی ژن GAPDH با روش $2^{-\Delta Ct}$ برآورد شد. میانگین $2^{-\Delta Ct}$ گروه کنترل محاسبه و سپس $2^{-\Delta Ct}$ هر نمونه با مقدار میانگین به‌دست‌آمده تقسیم شد تا میزان چند برابر شدن در بیان BTG1 تعیین شود. با توجه به اینکه نمونه‌های سالم و سرطانی این مطالعه از دو فرد جداگانه تهیه شده است، تغییرات بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta Ct}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Livak et al., 2001). برای رسیدن به نتیجه‌گیری قابل اعتماد، باید ثابت شود که تغییرات Cts برای ژن مرجع (GAPDH) از نظر آماری در دو گروه قابل توجه نیست.

Trizol (شرکت Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. به‌طور خلاصه، یک میلی‌متر مربع از بافت یخ زده (۳۰ میلی‌گرم) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول Bioneer و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم در میکرو لوله‌های استریل مخلوط شد. مراحل استخراج RNA طبق دستورالعمل‌های ارائه‌شده توسط سازنده کیت انجام شد. سرانجام، RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Picodrop (جذب در ۲۹۰ نانومتر) محاسبه شد. درنهایت، محصول استخراج شده به ژل آگارز منتقل شد و کیفیت استخراج RNA استخراج شده ارزیابی شد.

طراحی پرایمر

ابزار برخط Primer BLAST برای طراحی جفت‌های آغازگر در محل اتصال اگزون به اگزون در ژن‌های BTG1 و GAPD استفاده گردید. ویژگی آغازگرهای طراحی‌شده نیز توسط همین نرم‌افزار ارزیابی شد. پارامترهای ترمودینامیکی آغازگرها با استفاده از ابزار تحلیلگر Oligo مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای طراحی‌شده از نظر دایمر، حلقه برآمدگی و ساختار ثانویه حلقه سنجاق مو در شرایط واکنش بررسی شدند. لازم به ذکر است که تمام آغازگرها به‌طور مشابه و با در نظر گرفتن بهترین پارامترهای ترمودینامیکی و ویژگی انتشار طراحی‌شده‌اند. علاوه بر این، آغازگرها به گونه‌ای طراحی‌شده‌اند که قادر به تقویت انواع مختلف ژن‌های هدف هستند. پس از سنتز آغازگر (پودر لیوفیلیزه) محلولهای حاوی آغازگر با غلظت ۱ pmol/μl با افزودن آب اتوکلاوی عاری از نوکلئاز تهیه شدند. برای ارزیابی کیفیت آغازگرها، یک رقت‌سازی سریالی (۱، ۰/۱ و ۰/۰۱) برای cDNA هر ژن تهیه شد و شیب منحنی استاندارد رسم شده محاسبه شد.

qRT-PCR

برای بررسی سطح بیان ژن‌های موردنظر، واکنش

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. برای ترسیم نمودارهای مربوطه از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۶ استفاده شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از شاخص‌های آماری مانند میانگین و انحراف معیار انجام شد. برای مقایسه نسبت بیان ژن‌ها در دو گروه، توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به تناسب نتایج، از آزمون‌های پارامتریک و غیرپارامتری (Mann Whitney and Student t test) استفاده شد. از آنجا که تمام داده‌های به دست آمده غیرطبیعی بودند، از آزمون Man Whitney برای مقایسه بین گروه بافت سرطانی و بافت سالم استفاده شد. نتایجی از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد که $p < 0.05$ بود.

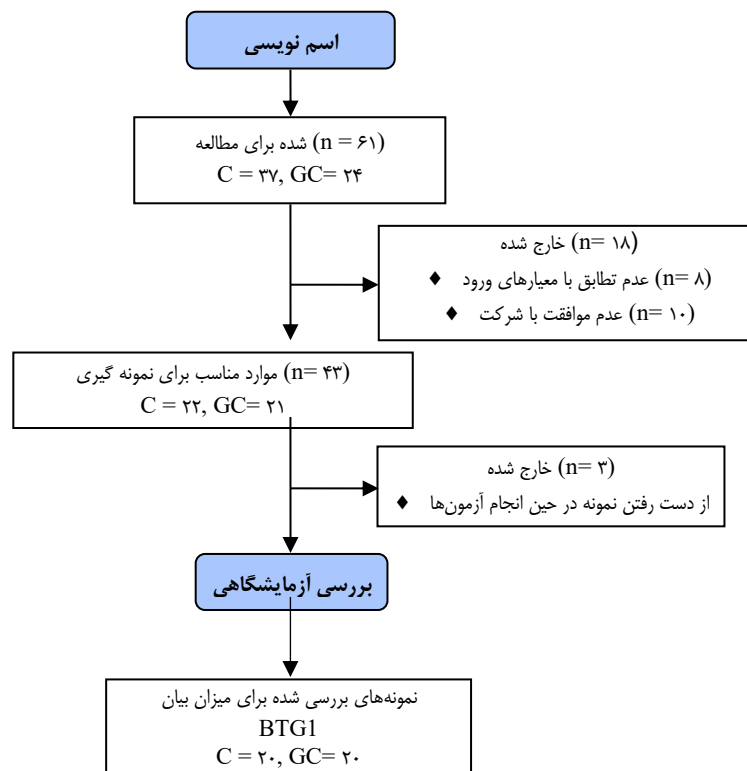
نتایج

ویژگی‌های دموگرافیکی و جمع آوری نمونه تلاش شد که افراد مورد مطالعه از نظر مشخصات

دموگرافیک شرایط مشابهی داشته باشند. میانگین سنی شرکت کنندگان شامل $51 \pm 29/17$ سال بود. از میان افرادی که در این مطالعه شرکت کرده بودند، ۲۲ نفر (۵۵ درصد) مرد و بقیه زن بودند. نمودار CONSORT از افراد جذب شده در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها با موفقیت از همه بیماران به دست آمد و فقط ۴ نمونه در طی نمونه‌برداری یا مراحل مطالعه از دست رفت. خصوصیات اساسی شرکت کنندگان در مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. برای مقایسه تعداد زنان و مردان بین دو گروه، آزمون مجذور کای انجام شد و مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود ندارد ($P = 0.935$). بنابراین، جنسیت یک عامل مداخله‌گر در این مطالعه نیست. علاوه بر این، از آزمون T برای مقایسه سن افراد در گروه‌های مطالعه استفاده شد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، گروه‌ها از نظر سن شرکت کنندگان تفاوت معناداری نداشتند ($P = 0.147$). برخی از شرکت کنندگان در گروه GC و گروه کنترل دارای متاستاز غدد لنفاوی، عفونت H. پیلوری و تمایز بافت شناسی بودند.

جدول ۱. داده‌های توصیفی برای افراد شرکت کننده در گروه‌های سرطانی و کنترل.

ویژگی	معیار	گروه GC (n=20) ۱۰۰٪	گروه کنترل (n=20) ۱۰۰٪	P value (سرطان علیه کنترل)
جنسیت	مرد	۱۱ (۵۵٪)	۱۱ (۵۵٪)	۰/۹۳۵
	زن	۹ (۴۵٪)	۹ (۴۵٪)	
سن (سال)	$29 \leq$	۵۵	۳۵.۵۰	۰/۰۱۴۷
اندازه تومور	< 5 cm	۸	-	۰/۰۰۸
	≥ 5 cm	۱۲		
فاز بالینی	Stage I- II	۶	-	۰/۰۰۵
	Stage III-IV	۱۴		
متاستاز غدد لنفاوی	مثبت	۷	-	۰/۰۳۲
	منفی	۱۳		
. پیلوری H عفونت	منفی	۵	۸	۰/۰۰۵
	مثبت	۱۵	۱۲	
تمایز بافت شناسی	مثبت	۵	۷	< 0.999
	منفی	۱۵	۱۳	



شکل ۱. نمودار CONSORT برای مطالعه انجام شده (C: کنترل، GC: سرطان معده)

درصد بازرسی شد. نتایج PicoDrop به دست آمده نشان می‌دهد که نسبت جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب در ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر مقادیری بین ۱/۸ تا ۲ برای نمونه‌های استخراج شده دارد (جدول ۳). این نتایج حاکی از آن است که نمونه‌های استخراج عاری از آلودگی‌های پروتئینی و فنلی هستند. باندهای ۲۸s، ۱۸s و ۵s موجود روی ژل آگارز ۱ درصد نشان‌دهنده کیفیت بالای فرآیند استخراج است (شکل ۲).

qRT-PCR

بیان BTGI با استفاده از PCR در زمان واقعی در دو گروه شامل بافت سرطانی و بافت سالم مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۴۰ نمونه شامل ۲۰ نمونه GC تأیید شده و ۲۰ نمونه افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی دقیق تر آزمایشگاهی مکانیسم عملکرد BTGI در GC، بیان BTGI در سلول‌های کنترل و GC بررسی شد.

طراحی آغازگر

آغازگرهای طراحی شده برای محل اتصال اگزون به اگزون در توالی‌های mRNA ژن‌های هدف تنظیم شدند. تجزیه و تحلیل ساختارهای ثانویه احتمالی در توالی‌های آغازگر نشان داد، که هیچ ساختار ثانویه مزاحم مانند دایمرهای آغازگر، حلقه‌های برآمدگی و حلقه‌های سنجاقی نمی‌تواند در شرایط واکنش تشکیل شود. توالی‌ها و ویژگی‌های مختلف آغازگرهای طراحی شده در جدول ۲ ارائه شده است. شیب منحنی استاندارد نتایج PCR برای ژن‌های GAPDH در حدود -3250 و در ژن‌های BTGI حدود -34550 بود. بازده نیز برای GAPDH و BTGI به ترتیب ۲ و ۱/۹۵ محاسبه شد. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کیفیت بالای آغازگرهای طراحی شده می‌باشد (جدول ۳).

بررسی RNA

خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه PicoDrop ارزیابی شد و توسط ژل آگارز ۱

با این حال، تفاوت معنی داری در سطح بیان BTG1 از نظر سن و جنس شرکت کنندگان مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از شاخص‌های آماری مانند میانگین و انحراف معیار انجام شد (شکل ۳). از آنجاکه تمام داده‌های به دست آمده غیرطبیعی بودند، برای مقایسه نتایج گروه بافت سرطانی و گروه سالم از آزمون

Man Whitney استفاده شد. لازم به ذکر است که هیچ افزایش معنی داری از Ct برای ژن GAPDH در گروه سرطان ($22/52 \pm 0/80$) در مقایسه با گروه شاهد ($23/07 \pm 0/91$) مشاهده نشد ($P=0/38$). این بدان معنی است که تفاوت بین ژن GAPDH در گروه‌های سرطانی و کنترل از نظر آماری معنی دار نیست.

جدول ۲. توالی و ویژگی‌های آغازگرهای طراحی شده

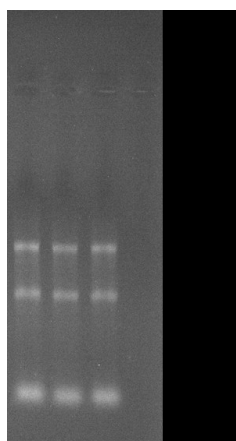
نام mRNA	توالی	اندازه محصول (bp)	Tm (°C)	شماره شناسایی NCBI
GAPDH	۵'- GTATCGTGGAAGGACTCATGAC -۳' (forward)	۱۳۶	۶۱	۵.۰۱۴۲۲۴>NM_
	۵'- GTAGAGGCAGGGATGATGTTC -۳' (reverse)			
BTG1	۵'- TGCTGGCAGAACATTATAAAC -۳' (forward)	۱۱۴	۸۵	۶.۰۰۱۰۷۹۸۰۸>NM_
	۵'-TGTGCTGCCTGTCCAATC -۳' (reverse)			

جدول ۳. نتایج بررسی کیفیت آغازگرهای طراحی شده

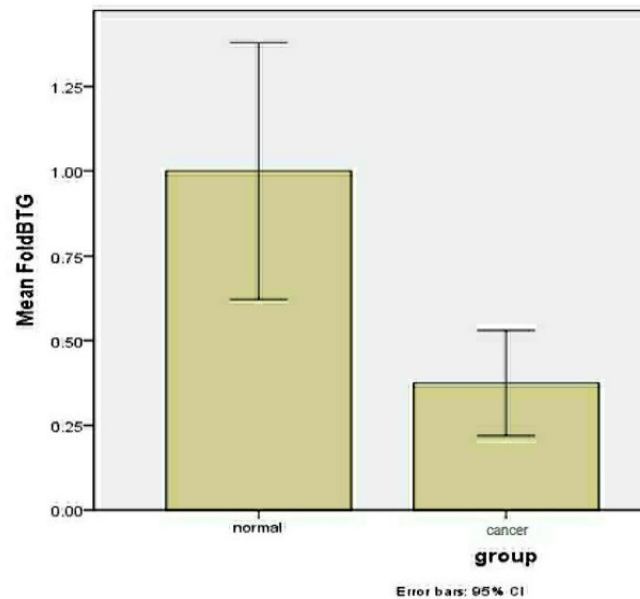
نام ژن	شیب نمودار	میزان بهره‌وری	۲R
GAPDH	-۳.۳۲۵۰	۲	۱
BTG1	-۳.۴۵۵۰	۱/۹۵	۰/۹۸

ادامه جدول ۳. نتایج جذب برای نمونه‌های استخراج RNA

شماره نمونه	غلظت	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰
۱	۲۲۹	۱.۹۶	۱.۹۳
۲	۳۷۶	۱.۹۳	۱.۹۰
۳	۳۶۷	۱.۹۰	۱.۹۶
۴	۳۹۵	۱.۹۲	۱.۹۴



شکل ۲. نتایج استخراج RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ باندهای مختلف RNA روی ژل نشان داده شده‌اند.



شکل ۳. تغییر بیان ژن BTG1 در بافت سرطانی و سالم. نتایج به صورت SD گزارش شده‌اند. طبیعی: بافت سالم، سرطان: سرطان معده.

بحث و نتیجه‌گیری

نشانه‌های زیستی مرتبط با بیماری‌ها، قبلاً توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند تا نیاز فوری به تشخیص زود هنگام بدخیمی‌های کشنده را برطرف کنند (Zheng *et al.*, 2015). غربالگری گسترده توسط این نشانه‌های زیستی برای بیماری‌های دارای شیوع بالا و عواقب جدی مورد نیاز است (Sun *et al.*, 2015). اقدامات درمانی باید در مراحل اولیه ابتلا به چنین بیماری‌هایی انجام شود (Zheng *et al.*, 2015). بنابراین، به نظر می‌رسد یافتن نشانه‌های زیستی جدید، که قادر به پیش‌بینی زودهنگام و دقیق نتایج بیماری باشند، برای بیماری‌هایی مانند سرطان که پیامدهای عمیق سلامتی و اقتصادی دارند، ضروری است (Sun *et al.*, 2014). با توجه به این شرایط، کاربرد بالقوه BTG1 به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص GC مورد ارزیابی قرار داده شد (Lu *et al.*, 2014).

تنظیم می‌کند (Zhu *et al.*, 2015). پروتئین BTG1 در فرایندهای مختلف سلولی مانند تقسیم سلولی، ترمیم DNA، تنظیم رونویسی و پایداری RNA پیام‌رسان نقش دارد (Zhao *et al.*, 2013). همچنین می‌تواند بر روند رشد، تمایز و تنظیم هموستاز تحت فشار سلولی تأثیر بگذارد (Kuo *et al.*, 2003). مطالعات متعددی که ارتباط بین BTG1 و تومورهای مختلف را بررسی کرده‌اند نشان داده‌اند که این ژن به‌طور غیرطبیعی در GC (Malekzadeh *et al.*, 2019)، سرطان کلیه (Steghs *et al.*, 2019)، کبدی (Song *et al.*, 2018)، سرطان حلق (Yuniati *et al.*, 2019)، سرطان تخمدان (Sun *et al.*, 2015)، سرطان پستان (Sun *et al.*, 2014)، سرطان ریه (Lu *et al.*, 2014)، گلیوبلاستوما (Sun, 2014) و سرطان دهانه رحم (Zhao *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013) کاهش بیان پیدا کرده است. مطالعات اخیر نشان داده است که BTG1 عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی دارد. تنظیم‌کننده منفی عملکرد اصلی این ژن می‌باشد بیان کم BTG1 در سرطان

ژن BTG1 عضوی از خانواده پروتئین‌های ضد تکثیر انسان است که برای اولین بار در سرطان خون لنفوسیت B مشاهده شد. بیان غیرطبیعی BTG1 در تومورهای مختلف، رشد و نمو آنها را

افزایش اتوفاژی، افزایش آپوپتوز و پیش آگهی بدتر در بیماران مبتلا به GC همراه است. آنها همچنین اظهار داشتند که بیان پایین BTG1 ممکن است تومورزایی معده را افزایش دهد. این ویژگی می‌تواند تا حدی ریشه در متیلاسیون پروموتور BTG1 داشته باشد (Sun *et al.*, 2014). Sheng *et al.* (2014) نشان داده‌اند که BTG1 می‌تواند به‌عنوان یک ژن مهار کننده تومور در سرطان خون عمل کند. حذف BTG1 می‌تواند به‌طور چشمگیری خطر بازگشت در لوسمی حاد لنفوبلاستیک حاد سلول B-IKZF1 را افزایش دهد.

لازم به ذکر است که مطالعه حاضر بر اساس این مفهوم طراحی شده است که از نظر جنسیت تفاوت معناداری بین افراد در دو گروه مطالعه وجود ندارد. سن یکی از مهمترین عوامل در ایجاد و پیشرفت سرطان است. سن شروع GC در کره جنوبی ۵۴ تعیین شده است که بسیار کمتر از ژاپن (۶۴ تا ۶۶ سال) است (Baek *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2010). در این مطالعه میانگین سن بیماران سرطانی ۵۵ سال بود. برای تأیید بهتر نتایج، بافت عضلانی از مخاط معده جدا شد. تا از ناخالصی‌های عضله‌ای BTG1 جلوگیری کند. برای خلاص شدن از سلول‌های استرومایی یا التهابی نیز از آندوسکوپی برای جمع‌آوری بافت طبیعی و سلول‌های سرطانی استفاده شد. نتایج PCR در زمان واقعی ما برای بافت نرمال و سلول‌های سرطانی، داده‌های مشابهی را با بافت معده ارائه می‌دهد. بنابراین، محتمل ترین توضیح برای این پدیده متناقض بی‌ثباتی mRNA ژن BTG1 و میزان بیان بسیار پایین پروتئین BTG1 در سلول‌های سرطانی معده باشد. با این حال، این مشاهدات با یافته‌های مطالعات ارزیابی سرطان پستان، ریه، تخمدان و کبد مطابقت داشت (Sun *et al.*, 2014; Kanda *et al.*, 2015; Baek *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015).

ما بیان BTG1 را در GC تجزیه و تحلیل کرده و امکان استفاده از آن به‌عنوان یک نشانگر زیستی

روده بزرگ با ویژگی‌های بالینی-پاتولوژیک، بازگشت بعد از عمل و بقای بیمار ارتباط دارد (Sun *et al.*, 2014). به علاوه بیان کم BTG1 در گلیوما اثر مهاری بر روی تومور دارد (Wang *et al.*, 2019). پیشنهاد شده است که اثر ضدسرطانی BTG1 با مهار مسیر Wnt/ β -catenin ارتباط داشته باشد (Wang *et al.*, 2019). کاهش بیان BTG1 در کارسینوم سلول‌های کبدی گزارش شده است (Song *et al.*, 2018). این کاهش بیان به‌طور قابل توجهی با بقای بیماری بدون بازگشت بیماری همراه است (Zhu *et al.*, 2019). بیان BTG1 در گلیوم پایین است. این ژن اثر مهارکننده در تومور گلیوم دارد که اثر ضد سرطانی آن با مهار مسیر Wnt/ β -catenin ارتباط دارد (Zhang *et al.*, 2021). افزایش بیان BTG1 منجر به افزایش حساسیت به تابش سرطان پستان می‌شود. ترکیبی از افزایش بیان BTG1 و پرتودرمانی می‌تواند از طریق تنظیم مسیرهای پیام رسانی مربوط به آپوپتوز و چرخه سلولی، کارایی درمان سرطان پستان را بهبود بخشد (Qian *et al.*, 2019).

نتایج ما در این مطالعه با نتایج تحقیقات اخیر سازگار می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که BTG1 ممکن است یک ژن مهارکننده تومور باشد. بیان BTG1 در مراحل G0/G1 چرخه سلولی در حداکثر میزان خود است و با پیشرفت سلول‌ها به مرحله G1 کاهش می‌یابد (Kanda *et al.*, 2015). بنابراین، بیان کم BTG1 می‌تواند از تکثیر سلول و پیشرفت چرخه سلولی جلوگیری کند. همچنین باعث آپوپتوز سلولی و کاهش اندوتلیوم عروقی شود (Kanda *et al.*, 2015). افزایش بیان BTG1 نشانه پیش آگهی مطلوب در سرطان پستان، سرطان تخمدان، سرطان سلول کبدی، سرطان گلو، سرطان مری و سرطان تیروئید است (Rouault *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015). Sheng *et al.* (2014) نشان داده‌اند که بیان BTG1 با مهار تکثیر،

یک هدف مولکولی برای ژن درمانی در آینده استفاده شود.

با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک و تکنیک های مولکولی، بیان BTG1 در بیماران GC و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت. بیان کم این ژن در بیماران مبتلا به GC می‌تواند بیانگر آن باشد که BTG1 نقش مهمی در وقوع و پیشرفت GC دارد و می‌تواند از رفتار بیولوژیک بدخیم بیماری جلوگیری کند. از آنجا که سطح BTG1 در تمام بیماران GC به‌طور قابل توجهی پایین بود، ما معتقدیم که BTG1 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر بالقوه پیش‌آگهی و تشخیصی GC استفاده شود.

در GC را بررسی کرده ایم. براساس نتایج ۲۰ مورد GC، میزان بیان BTG1 به‌طور قابل توجهی کمتر از گروه کنترل سالم بود. این امر نشان‌دهنده مناسب بودن این ژن جهت استفاده به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای GC است. می‌توان نتیجه گرفت که BTG1 ممکن است در انواع مختلف سرطان عملکرد ضد توموری مشترکی داشته باشد. با این حال، ارتباط بین بیان BTG1 و مکانیسم‌های تومورزایی یا پیش‌آگهی هنوز بحث برانگیز است. این مشاهدات همچنین می‌تواند نشان دهد که کاهش تنظیم BTG1 ممکن است بدخیمی اپیتلیال را تغییر دهد. بیان کم BTG1 ممکن است به‌عنوان

REFERENCES

- Bray, F.; *et al.* (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*; 68(6): 394-424.
- Baek, S.M.; Kim, N.; Kwon, Y.J.; *et al.* (2020). Role of Serum Pepsinogen II and Helicobacter pylori Status in the Detection of Diffuse-Type Early Gastric Cancer in Young Individuals in South Korea. *Gut Liver*; 14(4): 439-449. doi:10.5009/gnl19091.p-18
- Chen, X. Q.; Meng, F. Q.; Xiong, H.; Wang, Y. L.; Tang, W. H.; Zou, Y. M. (2020). Identification of BTG1 status in solid cancer for future researches using a system review and meta-analysis. *Current Medical Science*; 40(1): 85-94. doi:10.1007/s11596-020-2150-z,
- Fonseca-Camarillo, G.; Furuzawa-Carballeda, J.; Priego-Ranero, Á.A.; Martínez-Benítez, B.; Barreto-Zúñiga, R.; Yamamoto-Furusho, J.K. (2021). Expression of TOB/BTG family members in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*; 93: e13004. p-3
- Jie, M.; *et al.* (2020). CircMRPS35 suppresses gastric cancer progression via recruiting KAT7 to govern histone modification. *Molecular cancer*; 19(1): p. 1-16.p-3
- Kim, M.; Jo, H.; Kwon, Y.; Kim, Y.; Jung, H.S.; Jeoung, D. (2020). Homoharringtonine inhibits allergic inflammations by regulating NF-κB-miR-183-5p-BTG1 Axis. *Front Pharmacol*; 11: 1032. 10.3389/fphar.p4-18
- Kuo, M.L.; *et al.* (2003). Arf induces p53-dependent and -independent antiproliferative genes. *Cancer Res.*; 63(5): 1046-53.p-4-16
- Kanda, M.; *et al.* (2015). B-cell translocation gene 1 serves as a novel prognostic indicator of hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*; 46(2): 641-648.P-17
- Kanda, M.; *et al.* (2015). Diversity of clinical implication of B-cell translocation gene 1 expression by histopathologic and anatomic subtypes of gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*; 60(5): 1256-1264.P-17-18
- Kim, N.; Jung, H.C. (2010). The role of serum pepsinogen in the detection of gastric cancer. *Gut and liver*; 4(3): 307. p-4-18
- Lu, Y.; *et al.* (2014). BTG1 expression in thyroid carcinoma: diagnostic indicator and prognostic marker. *International journal of oncology*; 45(4): 1574-1582. P-16

- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4): 402-408.p-4
- Malekzadeh, R., M.H. Derakhshan, and Z. Malekzadeh, (2009). Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. p-4-16
- Qian, Y.; *et al.* (2019). The treatment effects and the underlying mechanism of B cell translocation gene 1 on the oncogenesis of brain glioma. *Journal of cellular biochemistry*; 120(8): 13310-13320. P-17P-4
- Rawla, P.; Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Przeglad gastroenterologiczny*, 14(1): 26.
- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L. (2020). Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2021.p-3
- Song, M.; *et al.* (2018). Serum pepsinogen 1 and anti-Helicobacter pylori IgG antibodies as predictors of gastric cancer risk in Finnish males. *Alimentary pharmacology & therapeutics*; 47(4): 494-503.p-3
- Strand, M.S.; Lockhart, A.C.; (2017). Fields, Genetics of gastric cancer. *Surgical Clinics*, 97(2): 345-370.p-3
- Sullivan, C.B.; *et al.* (2019). Survival outcomes for advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*; 128(10): 949-955. p-3
- Sasajima, H.; Nakagawa, K.; Yokosawa, H. (2002). Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *European journal of biochemistry*; 269(14): 3596-3604. p-4
- Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*; 3(6): 1101.p-6
- Steeghs, E.M.; *et al.* (2019). Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Scientific reports*; 9(1): 1-11. P-16
- Sun, G.; *et al.* (2015). B cell translocation gene 1 reduces the biological outcome of kidney cancer through induction of cell proliferation, cell cycle arrest, cell apoptosis and cell metastasis. *International journal of molecular medicine*; 35(3): 777-783.P-16
- Sun, G.; *et al.* (2014). Expression of BTG1 in hepatocellular carcinoma and its correlation with cell cycles, cell apoptosis, and cell metastasis. *Tumor Biology*; 35(12): 11771-11779.P-18-6
- Sun, G.; *et al.* (2014). The expression of BTG1 is downregulated in nasopharyngeal carcinoma and possibly associated with tumour metastasis. *Molecular biology reports*; 41(9): 5979-5988.P-16
- Sheng, S.; Zhao, C.; Sun, G. (2014). BTG1 expression correlates with the pathogenesis and progression of breast carcinomas. *Tumor Biology*; 35(4): 3317-3326.P-18
- Sun, G.; *et al.* (2014). The expression of BTG1 is downregulated in NSCLC and possibly associated with tumor metastasis. *Tumor Biology*; 35(4): 2949-2957.P-18-16
- Winkler, G.S. (2010). The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *Journal of cellular physiology*; 222(1): 66-72.p-4-17
- Wang, Y.; *et al.* (2019). PUM2 promotes glioblastoma cell proliferation and migration via repressing BTG1 expression. *Cell structure and function*; 44(1): 29-39. P-17
- Zhang, S.-Q.; *et al.* (2017). miR-511 promotes the proliferation of human hepatoma cells by targeting the 3' UTR of B cell translocation gene 1 (BTG1) mRNA. *Acta Pharmacologica Sinica*; 38(8): p. 1161-1170.p-4

- Zhu, R., *et al.*, (2015). Upregulation of BTG1 enhances the radiation sensitivity of human breast cancer in vitro and in vivo. *Oncology reports*; 34(6): p. 3017-3024.p-16-18
- Zheng, H.-c., *et al.*, (2015). BTG1 expression correlates with pathogenesis, aggressive behaviors and prognosis of gastric cancer: a potential target for gene therapy. *Oncotarget*; 6(23): 19685.p-16
- Zhao, Y., *et al.*, (2013). BTG1 expression correlates with the pathogenesis and progression of ovarian carcinomas. *International journal of molecular sciences*; 14(10): 19670-19680.p-16
- Zhu, R., *et al.*, (2013). BTG1 inhibits breast cancer cell growth through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Oncology reports*; 30(5): p. 2137-2144.p-17
- Zhu, J.; Han, S. (2019). Lidocaine inhibits cervical cancer cell proliferation and induces cell apoptosis by modulating the lncRNA-MEG3/miR-421/BTG1 pathway. *American journal of translational research*; 11(9): 5404.P-17
- Zhang, J.; Dong, W. (2020). Expression of B cell translocation gene 1 protein in colon carcinoma and its clinical significance. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*; 15(1):78-85. p-16
- Yuniati, L., *et al.*, (2019). Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control. *Journal of cellular physiology*; 234(5): 5379-5389.P-16
- Yufang Huang, Jiawei Zheng, Ting Tan, Li Song, Shanshan Huang, Yan Zhang, Lin Lin, Jingnan Liu, Peichan Zheng, Xiong Chen, Xi Chen, Xuenong Ouyang, (2017). BTG1 low expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a poorer prognosis, *The International Journal of Biological Markers*, doi:10.5301/ijbm.5000310, 3, 2, (189-194), p. 1663-1670.p-4