

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن *SCAMP5* و *miR* هدف آن در بافت بیماران گلیوبلاستوما مولتی‌فرمنسرین کریمی^۱، حمیدرضا خیری^۲، وجیهه زرین پور^{۱*}، محمد مهدی فرقانی فرد^۱

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

۲- گروه زیست فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان، ایران

*مسئول مکاتبات: zarrinpour@damghaniau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1926616.1243

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۴

چکیده

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM) یکی از بدخیم‌ترین و رایج‌ترین تومورهای مغزی است و پس از درمان ترکیبی فعلی، بقای بیمار نسبتاً ضعیف است و این بیماری همواره کشنده است. هدف از این مطالعه بررسی بیان *SCAMP5* به عنوان بیومارکر احتمالی در گلیوبلاستوما مولتی‌فرم و بررسی *miR* هدف این ژن می‌باشد. در این مطالعه ۵۰ نمونه بافت مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم قبل از درمان و ۵۰ نمونه بافت سالم حاشیه تومور GBM به عنوان نمونه کنترل جمع‌آوری شد. برای تمام نمونه‌ها، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. بیان ژن *SCAMP5* با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد و از ژن *ACTB* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد. برای بررسی ارزش بیومارکری ژن *SCAMP5* از منحنی Roc استفاده شد. کاهش بیان ژن *SCAMP5* در نمونه‌های گلیوبلاستوما مولتی‌فرم مشاهده شد و بیان آن با مشخصات پاتولوژی بیماران مقایسه شد. بیان ژن *SCAMP5* با سن بیماران با $p < 0/05$ از لحاظ آماری معنادار بود و بیان ژن با جنسیت با $p > 0/005$ از لحاظ آماری معنادار نمی‌باشد. *SCAMP5* در بافت توموری بیماران مبتلا به GBM به مراتب کمتر از بافت سالم اطراف تومور بیان شده بود. نتایج نشان داد که در بیماران با سن بیشتر از ۵۰ سال میزان بیان ژن *SCAMP5* کاهش یافت. بررسی منحنی ROC نشان داد که ژن *SCAMP5* می‌تواند دارای ارزش بیومارکری باشد. با توجه به این بررسی شاید بتوان از بیان این ژن به عنوان مارکر یک راه تشخیصی زودهنگام استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *SCAMP5*، گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، Real-Time PCR، بیومارکر.

مقدمه

مغز و سیستم عصبی مرکزی و ۸۰ درصد تومورهای بدخیم مغز را تشکیل می‌دهند (۱۰). از نظر بالینی، گلیوما به چهار گرید تقسیم می‌شود؛ متأسفانه، تهاجمی‌ترین از این موارد، درجه ۴ یا گلیوبلاستوما مولتی‌فرم یا

تومورهای مغز، ۸۵ تا ۹۰ درصد از تومورهای اصلی سیستم عصبی مرکزی را تشکیل می‌دهند. گلیوما، شایعترین و کشنده‌ترین تومور مغزی اولیه در سیستم عصبی مرکزی است که در حدود ۳۰ درصد از تومورهای

است (۲۵). در واقع استفاده از بیومارکرها به عنوان هدف جدیدی برای درمان بسیار اهمیت دارد (۲۷). یکی از راه‌های یافتن مارکر مناسب بررسی بیان ژن‌ها و miR هایی است که در گلیوبلاستوما مولتی فرم بیان می‌شوند، یکی از این ژن‌ها *SCAMP5* (Secretory Carrier Membrane Protein5) می‌باشد. *SCAMP5* یک ژن کد کننده پروتئین است (۳۳). ژنوم‌های پستانداران حاوی پنج ژن *SCAMP1-SCAMP5* هستند (۴۰). از این گروه *SCAMP5* خاص مغز شناخته شده است و ژن آن در انسان بر روی کروموزوم ۱۵q است (۱۴). *SCAMP5* در فرآیندهای بیولوژیکی تنظیم منفی آندوسیتوز (۲۲)، تنظیم مثبت *exocytosis* وابسته به یون کلسیم، تنظیم مثبت ترشح سایتوکاین (۸)، انتقال پروتئین (۵)، پاسخ به استرس شبکه آندوپلاسمی (۲۲)، تنظیم دینامیک غشا (۴۰) و تنظیم *trafficking* غشا (۲، ۱۱، ۳۸) و انتقال وزیکول (۱۴) نقش دارد. در سلول‌های عصبی و غیر عصبی بیان می‌شوند (۲۴۸). در مغز (۸، ۳۸)، معده، سلول‌های اپی تلیال تیروئید، نخاع، غدد لنفاوی، نای، غده فوق کلیه، مغز استخوان و در قسمت‌های مختلف مغز بیان می‌شود (۸). کمپلکس *SCAMP5* با مولکول‌های *SNARE* از طریق بخش C ترمینال با *Syt I* و *Syt II* برهمکنش دارد (۸). همچنین پروتئین *SCAMP5* به مبدل *NHE7* متصل می‌شود (۱۹). از لحاظ ساختاری *SCAMP5* فاقد تکرار *N NPF* ترمینال هستند (۳۹). بیان پروتئین *SCAMP5* در بیماران مبتلا به اوتیسم (۲۳) و هانتینگتون (۲۰)، آلزایمر (۲۶) و سرطان پروستات (۳۷) مورد بررسی قرار گرفته شده است، اما بیان ژن *SCAMP5* بیشتر به صورت بیوانفورماتیکی در گلیوبلاستوما مولتی فرم مورد بررسی قرار گرفته است (۴).

(GBM) که در انسان شایع است (۱۲، ۲۵، ۲۶). یکی از بدخیم‌ترین انواع تومورهای سیستم عصبی مرکزی است (۹، ۲۵، ۳۲). گلیوبلاستوما مولتی فرم سرطانی تهاجم بالا و رشد سریعی دارد و معالجه به مکان تومور و توانایی بیمار به تحمل جراحی بستگی دارد؛ بنابراین، این سرطان به سختی درمان می‌شود (۲۷) با وجود پیشرفت در روش‌های درمانی، تا حد زیادی غیر قابل درمان است (۹). و با وجود پیشرفت‌های تحقیقی مهمی که در این چند دهه‌ی اخیر صورت گرفته است، بروز میزان بقای بیماران در این مدت تغییری نکرده است (۳، ۲۶) تعداد کمی از بیماران با گلیوبلاستوما بیش از دو سال پس از تشخیص زنده مانده‌اند (۳). بنابراین، این بیماری با تأکید بر لزوم رویکردهای نوآورانه برای مقابله با آن، در میان چالش‌برانگیزترین شرایط بهداشت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود (۲۶). در حال حاضر، از روش‌های قطعی برای تشخیص گلیوم بررسی بافت‌شناسی و تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) می‌باشد (۲۵). بنابراین، علاقه عمده‌ای به توسعه نشانگرهای زیستی وجود دارد که امکان نظارت کم هزینه بر بیماری را در فواصل زمانی کوتاه تر فراهم می‌کند (۲۵) علاوه بر این، بیماران در معرض خطر مرگ و میر ناشی از جراحی یا تومورهای کوچک می‌توانند از کشف نشانگرهای زیستی برای تأیید GBM برای جلوگیری از بیوپسی بهره مند شوند (۲۵). اگرچه تشخیص به موقع با مارکرهاى زیستی روشی ثابت در تشخیص و درمان بسیاری از انواع سرطان است. در حال حاضر آزمایش‌های تشخیصی گلیوم محدود است. بنابراین، داشتن مجموعه‌ای از مارکرها برای تشخیص به موقع هنوز یک هدف اصلی برای بهبود تشخیص و درمان گلیومای انسانی

در این مطالعه ۵۰ نمونه بافت مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم قبل از درمان از بیمارستان های امام خمینی و شهدا در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ و همچنین ۵۰ نمونه بافت سالم حاشیه تومور GBM به عنوان نمونه کنترل جمع آوری شد. نمونه‌های جمع آوری شده در بازه سنی ۴۶ تا ۷۷ سال بودند. بافت‌های تهیه شده به صورت بلوک-های پارافینه بودند. نمونه‌گیری زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان با شناسه اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1399.016 و تحت معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) و رضایت بیماران صورت گرفت.

در زمان انجام آزمایش تا ۸ برش نازک تهیه شده از بلوک که با میکروتوم بدست آمده را برداشته و در میکروتیوب ۱/۵ ml استریل ریخته شد. جهت دیپارافینه کردن نمونه‌ها از FFPE Paraffin Removal Solution (biotechrabbit, Germany) استفاده شد، که به هر نمونه ۳۲۰ μ l از بافر فوق افزوده و سپس به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس انجام شد و به مدت ۳ دقیقه در درمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از دیپارافینه نمونه-ها، RNA از نمونه بافت گلیوبلاستوما طبق دستورالعمل کیت (Roche, High Pure RNA Paraffin Kit Germany) استخراج گردید. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Eppendorf, Biophotometer Pluse Germany) دانسیته نوری (OD) ۲۸۰ و ۲۶۰ محاسبه شد و از نمونه RNAهایی که نتایج نسبت OD ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر آنها بین ۲- ۱/۸ بود، جهت سنتز cDNA استفاده شد. RNA استخراج شده به عنوان الگو برای سنتز cDNA استفاده شد و با استفاده از کیت cDNA AccuPower[®] RT/PCR PreMix (BioNEER, Oakland, USA) سنتز cDNA انجام شد.

MicroRNA ها از دسته‌ی RNA های کوچک کد کننده با طول ۱۸-۲۵ نوکلئوتید می باشند که عملکرد خود را در مرحله‌ی پس از رونویسی اعمال می‌کنند (۲۸) miRNA ها کنترل بیان RNA کد کننده پروتئین/ پروتئین غیر کد کننده را تنظیم می کنند (۲۱) بیان ۶۰ درصد ژن‌های انسانی را تنظیم می کنند (۱۳) و چندین، فرآیندهای بیولوژیکی از جمله چرخه سلولی، تکثیر، متابولیسم، پاسخ ایمنی، خونسازی و تمایز به طور گسترده‌ای توسط miRNA ها تنظیم می‌شود (۴۲، ۳۴، ۲۵، ۱۵) همچنین تغییرات غیرطبیعی در بیان miRNA با وقوع و پیشرفت بیماری‌های انسانی مرتبط است (۲۹). اختلال و تغییر در بیان MicroRNA ها در تمامی سرطان‌ها از جمله گلیوبلاستوما، قابل بررسی و مطالعه می‌باشد. MicroRNA ها غالباً در سرطان تنظیم می‌شوند و پتانسیل زیادی به عنوان نشانگرهای بافتی برای طبقه‌بندی و پیش آگهی سرطان از جمله گلیوم نشان داده‌اند (۲۵). با توجه به نقش مهم و حیاتی تحقیقات در زمینه یافتن مارکر زیستی مناسب در گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، هدف از این مطالعه بررسی سطح بیان SCAMP5 در نمونه‌های بافت توموری گلیوبلاستوما با استفاده از تکنیک Real-Time PCR (polymerase chain reaction) و همچنین، سطح بیان SCAMP5 بین درجه-های مختلف گلیوبلاستومای مولتی‌فرم می‌باشد و با نمونه‌های بافت سالم از حاشیه گلیوبلاستوما مولتی فرم مقایسه خواهد شد و miR هدف آن با استفاده از نرم-افزارهای بیوانفورماتیکی شناسایی شد و مسیرهای مرتبط و ژن‌های دخیل در مسیر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

واکنش تکثیر به روش Ct (Cycle Real-timePCR threshold) نمونه‌ها توسط دستگاه بدست آمد و تجزیه و تحلیل CT نمونه‌ها با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد و بررسی تغییرات بیان با استفاده از کمیت سنجی نسبی و $Relative Quantification$ (RQ) انجام شد. اساس این روش بر پایه تعیین نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن مرجع است. در این روش بایستی $PCR efficiency$ هر دو ژن تقریباً برابر باشد.

آنالیز آماری: در این مطالعه داده‌ها به صورت $\pm mean \pm SD$ بیان می‌شوند. تجزیه و تحلیل آماری برای تشخیص تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون T-test و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و آزمون Man-Whitney برای متغیرهایی که توزیع طبیعی نداشتند، استفاده شد. برای ارزیابی حساسیت و ویژگی ژن $SCAMP5$ به عنوان بیومارکر زیستی در نمونه‌های گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم از منحنی ROC استفاده شد و بهترین برش از طریق بالاترین حساسیت و ویژگی تعیین شد. تمام آنالیزهای آماری توسط GraphPad Prism V.8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) انجام شد.

آنالیز مسیر سیستماتیک: اطلاعات ثبت شده درباره ژن $SCAMP5$ و miR هدف آن از دیتابیس‌های مختلف از جمله NCBI، UniPort، Signor، miRWalk2.0 و DAVID ورژن ۶.۸ (۳۰) و KEGG (۱۶) برای تفسیر سیستماتیک ژن $SCAMP5$ و miR هدف آن استفاده شد.

برای انجام واکنش رونویسی معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتیگراد و انکوبه شد. پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های $SCAMP5$ و $ACTB$ با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner Version 6.5.52 Beta طراحی شدند و برای اطمینان از صحت آنان از Primer-Blast استفاده شد، سپس به شرکت سازنده Metabion international AG (Steinkirchen, Germany) داده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. سپس جهت انجام Real-time PCR از RT² SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, Germany) استفاده شد. سطح mRNA ژن $SCAMP5$ و ژن کنترل داخلی $ACTB$ (Actin Beta) پس از بهینه‌سازی بر روی نمونه‌های بیمار و سالم به صورت کمی در دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) انجام شد و منحنی‌های تکثیر و ذوب به وسیله دستگاه رسم شد. واکنش‌های Real-time PCR برای هر نمونه با سه بار تکرار انجام شد. واکنش نمونه‌های مورد نظر طی ۳ مرحله به صورت زیر انجام پذیرفت: مرحله اول holding در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم به طور متناوب در طول ۴۵ سیکل جهت دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال و گسترش در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد، و مرحله سوم در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. پس از انجام

جدول ۱- توالی پرایمرهای $SCAMP5$ و $ACTB$

ژن	توالی پرایمرها (۵'-۳')	طول قطعه (جفت باز) دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
----	------------------------	---

SCAMP5 F	ACCTTCATGGCTCAGTTGG	۵۷/۳۴	۱۹۲
SCAMP5 R	TTATGAACCATGCTGAGGG	۵۵/۴۰	
ACTB F	ATGTACGTTGCTATCCAGGC	۵۷/۷۶	۷۰
ACTB R	AGTCCATCACGATGCCAG	۵۶/۷۳	

نتایج

در نرم افزار GraphPad Prism 8 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مقایسه بیان ژن SCAMP5 با جنسیت بیماران با $p = ۰/۵۹۸$ از لحاظ آماری ارتباط معناداری دیده نشد (شکل ۴) و در مقایسه بیان ژن SCAMP5 با سن بیماران با $P_{\text{value}} = ۰/۰۰۰۷$ ارتباط معناداری دیده شد (شکل ۵). آنالیز نتایج بدست آمده از آزمایش کمی میزان بیان ژن SCAMP5 در بافت های GBM و بافت سالم حاشیه تومور GBM نشان داد که در بافت GBM نسبت به بافت نرمال کاهش بیان داریم و از نظر آماری اختلاف معناداری وجود دارد ($p < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۶) در واقع با توجه به نتایج کاهش بیان ژن SCAMP5 در گلیوبلاستوما مولتی فرم مشاهده شد. تجزیه و تحلیل منحنی Receiver operating characteristic (ROC) جهت ارزیابی ارزش بیومارکری SCAMP5 در نمونه های بافت توموری گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم انجام شد، همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است. سطح زیر منحنی (AUC) با انحراف معیار برای برابر با $۰/۸۷۱ \pm ۰/۰۳۷$ است. آنالیز منحنی ROC نشان داد که مقدار SCAMP5 می تواند به خوبی بین بیماران و افراد کنترل افتراق قائل شود. با آنالیز منحنی و تعیین cut-off برای این ژن مشخص گردید که میزان Cut-off ژن SCAMP5 برابر با $۰/۹۴۷۱ -$ و به ترتیب حساسیت و اختصاصیت آن $۰/۷۸$ و $۰/۹۲$ می باشد. در این مطالعه از وب سایت miRwalk برای شناسایی miR هدف مورد استفاده قرار گرفت و پس از قرار دادن miR هدف در سایت آنالیز DAVID، مسیرهای سیگنالینگ KEGG

تست Real-Time PCR پس از بهینه سازی برای هر دو ژن مورد نظر SCAMP5 و ACTB بر روی نمونه های بیمار و سالم انجام شد. نمودار خطی منحنی های تکثیر ژن های نمونه ها توسط اندازه گیری تغییرات میزان فلورسانس به وسیله دستگاه رسم شد (به ترتیب شکل ۱). سپس جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و رنگ فلورسانس (SYBR Green) و اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی و دایمر پرایمر در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب برای ژن های SCAMP5 و ACTB (شکل ۲. A و B) به صورت جداگانه توسط دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System رسم گردید، که این امر تأییدی بر اتصال صحیح پرایمرها و اختصاصیت آن در ژن های مورد نظر می باشد. در این مطالعه مشخصات کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم (سن، جنس) مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۲ نشان داده شده است. همچنین ارتباط بیان ژن SCAMP5 با مشخصات کلینیکوپاتولوژی بیماران بررسی شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین میانگین RQ ژن SCAMP5 در جدول ۲ نشان داده شده است. بیان ژن SCAMP5 در نمونه های مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم در شکل ۳ نشان داده شده است، که بیشترین بیان مربوط به نمونه ی ۳۵ می باشد و کمترین بیان مربوط به نمونه ی ۴۱ می باشد. نتایج بیان ژن SCAMP5 در نمونه های مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم با سن و جنسیت با استفاده از آزمون T-test

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۳). مجموعه ژن‌های درگیر در سرطان و مسیرهای سیگنالینگ PI3K-AKT، mTOR، Calcium، MAPK، glioma، AMPK، cAMPK، VEGF، Wnt و ErbB بودند (شکل ۸).

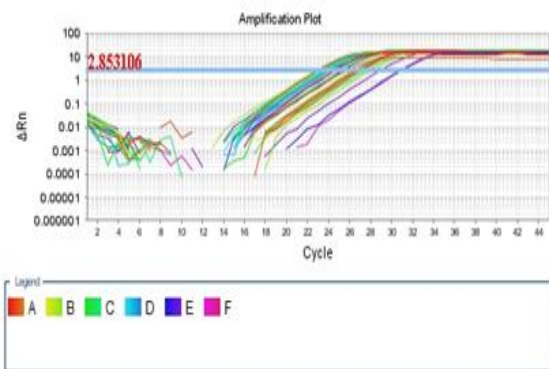
جدول ۲- بررسی ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و بیان ژن SCAMP5

میانگین SCAMP5 RQ	کل	نرمال	گلیوبلاستوما مولتی فرم	
۱/۶۹۹	۱۰۰	۵۰	۵۰	تعداد افراد
۱/۸۷۸	۳۶	۲۰	۱۶	سال <۵۰
۱/۵۹۹	۶۴	۳۰	۳۴	سال >۵۰
بیان SCAMP5				
میانگین SCAMP5 RQ				
بیشترین SCAMP5RQ				
کمترین SCAMP5 RQ				
جنسیت				
۱/۷۴۱	۵۹	۳۰	۲۹	مرد
۱/۶۴۰	۴۱	۲۰	۲۱	زن

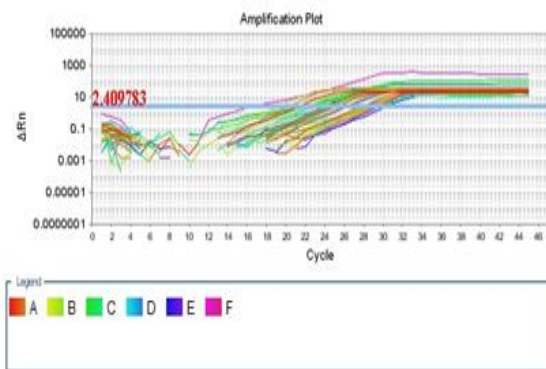
جدول ۳- آنالیز مسیر KEGG برای miR497-5P در ارتباط با گلیوبلاستوما مولتی فرم

مسیر	تعداد ژن‌های درگیر	P-value
Cancer	۸۳	۱/۱E-۸
MAPK signaling	۵۷	۳/۵E-۷
Glioma	۲۲	۴/۶E-۶
Calcium signaling	۴۲	۵/۶E-۶
mTOR signaling	۱۹	۱/۴E-۵
PI3K-AKT signaling	۶۷	۷/۷E-۶
AMPK signaling	۲۹	۱/۹E-۴
cAMPK signaling	۳۹	۶/۴E-۴
VEGF signaling	۱۶	۲/۶E-۳
Wnt signaling	۲۷	۵/۶E۳-
ErbB signal	۲۳	۱/۹E-۴

A

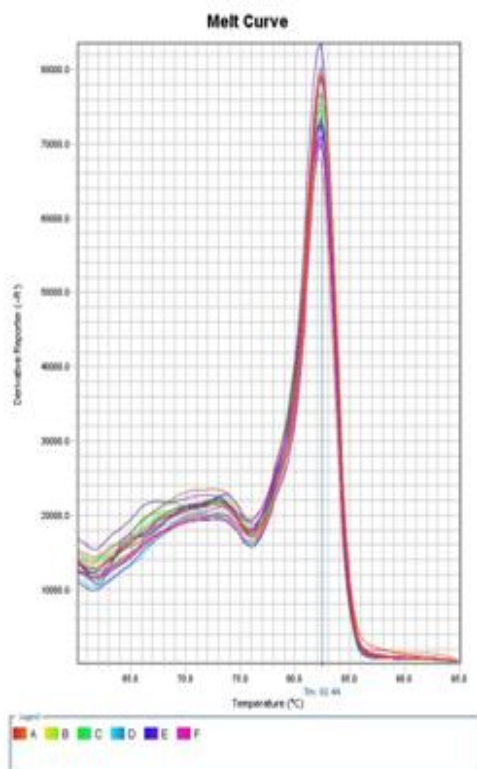


B

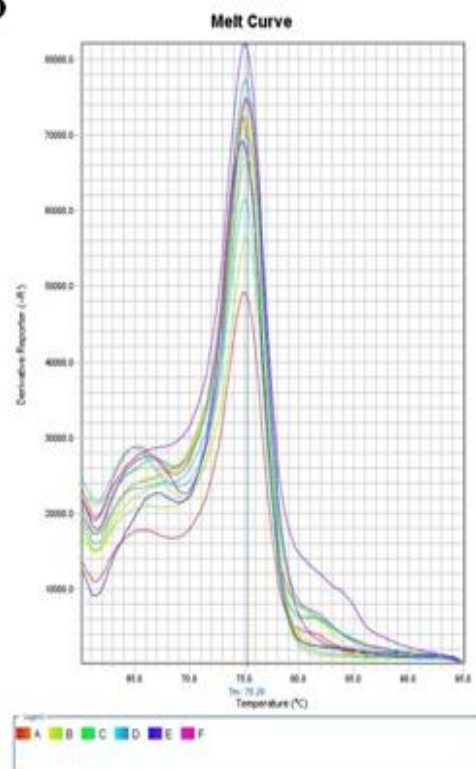


شکل ۱- منحنی تکثیر ژن های *ACTB* و *SCAMP5* در نمونه های بافت توموری GBM و نمونه های بافت سالم از حاشیه تومور . *SCAMP5* (B) *ACTB* (A) GBM

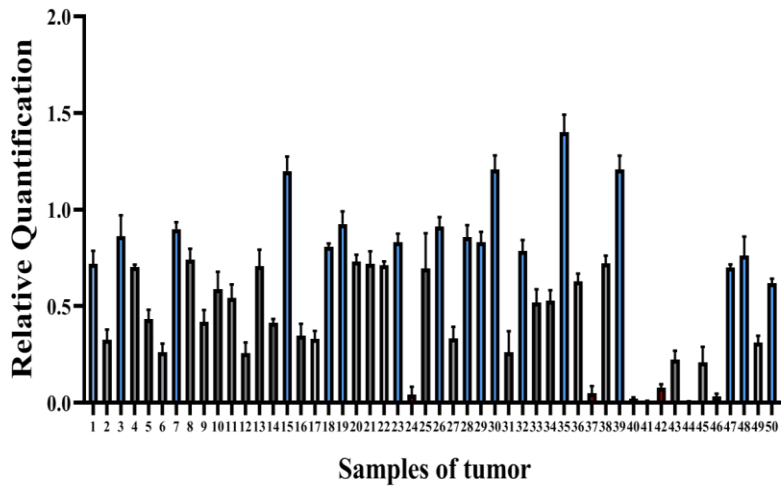
A



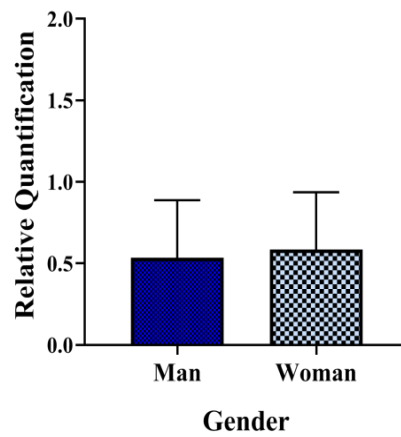
B



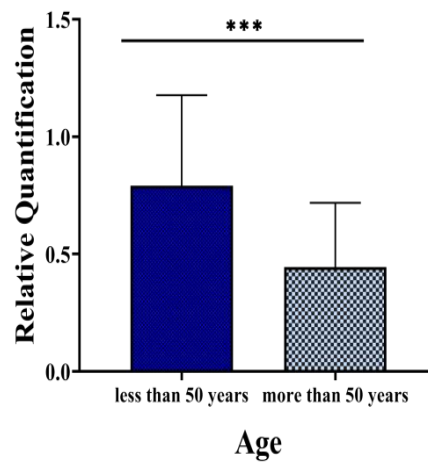
شکل ۲- منحنی ذوب ژن های *ACTB* و *SCAMP5* در نمونه های بافت توموری GBM و نمونه های بافت سالم از حاشیه تومور . *SCAMP5* (B) *ACTB* (A) GBM



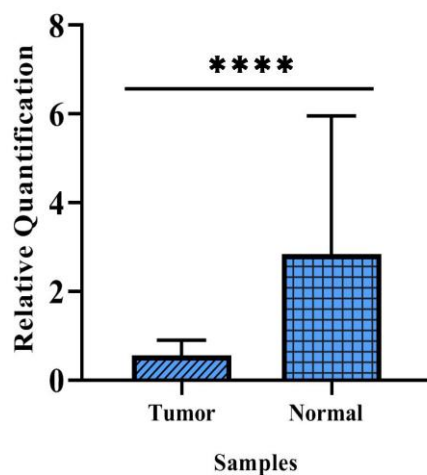
شکل ۳- بررسی میزان بیان ژن *SCAMP5* در ۵۰ نمونه بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم



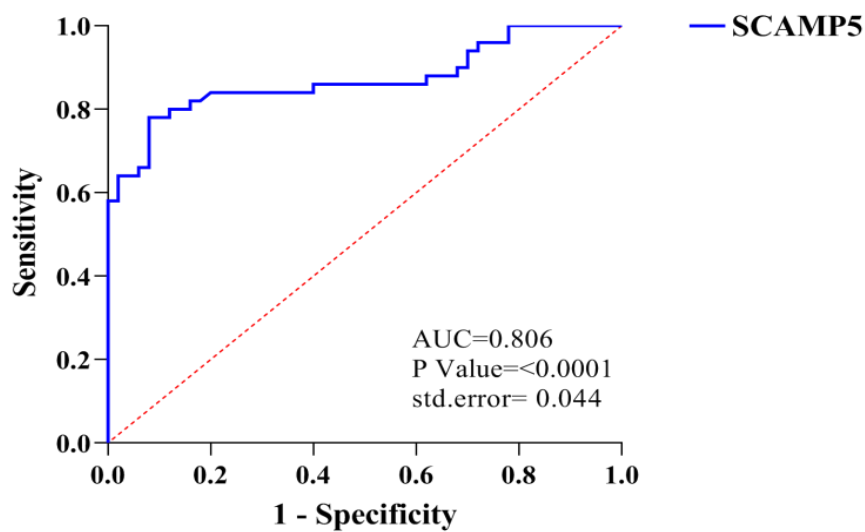
شکل ۴- بررسی بیان ژن *SCAMP5* در بیماران مبتلا به GBM براساس جنسیت. $p = 0/598$



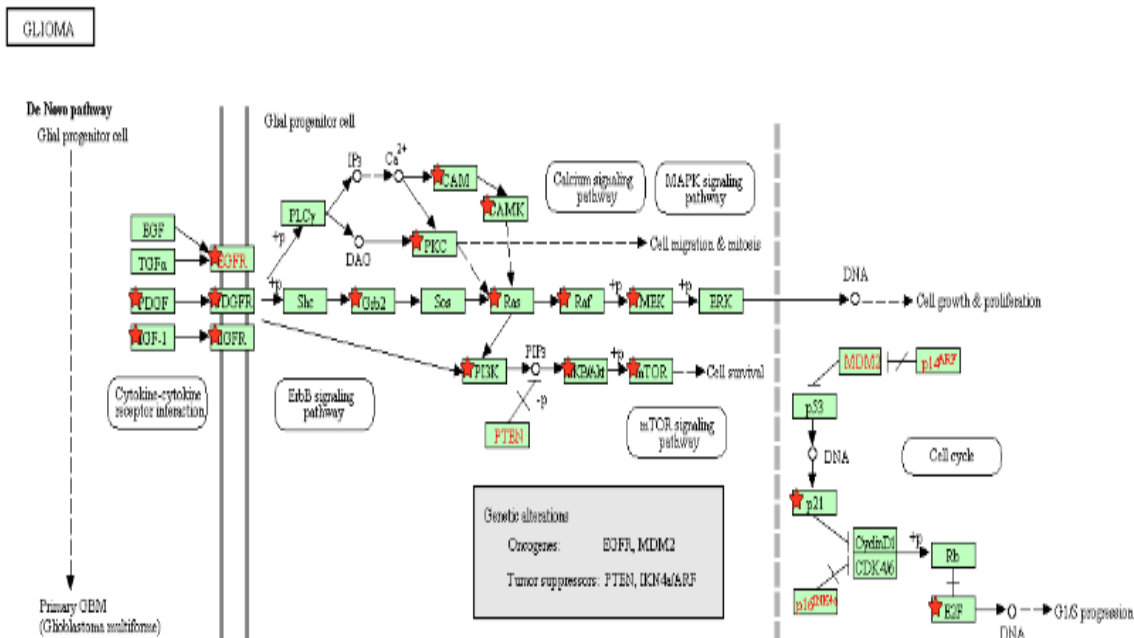
شکل ۵- بررسی بیان ژن *SCAMP5* در بیماران مبتلا به GBM بر اساس سن. $p = 0.0007$



شکل ۶- نمودار مقایسه بیان ژن *SCAMP5* در نمونه های بافت بیماران مبتلا به GBM و نمونه های سالم از حاشیه تومور GBM. $p < 0.0001$



شکل ۷- تجزیه و تحلیل منحنی ROC ژن *SCAMP5* در نمونه های بافت بیماران مبتلا به GBM و نمونه های بافت سالم از حاشیه تومور GBM



شکل ۸- ژن های درگیر در مسیر سیگنالینگ miR 497-5P. ژن های درگیر در مسیر سیگنالینگ با ستاره قرمز نشان داده شده است.

بحث

همچنین پس از درمان ترکیبی فعلی با شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی، بقای بیمار نسبتاً ضعیف است (۱۸). از این رو، درک تنظیم مولکولی رشد GBM برای بهبود درمان آن حیاتی است (۳۶).

در این مطالعه بیان ژن *SCAMP5* در بافت افراد مبتلا به سرطان گلیوبلاستوما مولتی فرم با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد و نتایج نشان داد که بیان ژن *SCAMP5* در بافت توموری، به مراتب کمتر از بافت سالم اطراف تومور است. در مورد بیان این ژن در گلیوبلاستوما مولتی فرم در ایران تحقیقی تا به امروز اعلام نشده است. براساس مطالعه های محققین نقش *SCAMP5* در سرطان هنوز مشخص نشده است. در مطالعه ی دیگری بیان خانواده ی *SCAMP* در بیماران مبتلا به سرطان خون حاد میلوئیدی براساس دیتابیس اطلس ژنوم سرطان مورد بررسی قرار گرفته و *SCAMP1* در این

GBM بدخیم ترین نوع تومور اولیه مغز است (۳۶، ۶). اگر چه رشد سلول های تومور در یک فضای نسبتاً بسته ممکن است تا حدی از بدخیمی آن باشد (۶، ۳۶). سلول های GBM بسیار متحرک هستند و به طور پراکنده به پارانشیم طبیعی مغز حمله می کنند و در نتیجه پیش آگهی ضعیفی دارند (۳۲). از آنجا که سد خونی- مغزی (BBB) در GBM مختل شده است، برخی از اجزای موجود در پلاسما یا سرم ممکن است بتوانند بر تحرک سلول GBM تأثیر بگذارند (۳۲) بدخیمی گلیوبلاستوما مولتی فرم عمدتاً به دلیل تهاجم موضعی آن و وجود تومور در ناحیه نسبتاً مهار شده در مغز است (۳۱). از این رو، پیشگیری مؤثر تهاجم سلول سرطانی برای کنترل رشد و زوال GBM بسیار مهم است (۳۱). ماهیت بسیار تهاجمی سلول های گلیوبلاستوما دلیل اصلی شکست روش های درمانی فعلی عنوان شده است (۶)

انجام شد که این miR هدف، miR-497 بود. بیشترین ژن‌های درگیر به ترتیب در مسیرهای سرطان، سیگنالینگ PI3K-AKT، سیگنالینگ MAPK، سیگنالینگ Calcium، سیگنالینگ cAMPK، سیگنالینگ AMPK، سیگنالینگ Wnt، گلیوما، سیگنالینگ ErbB، سیگنالینگ mTOR، سیگنالینگ VEGF بودند. miR-497 در کروموزوم 17p13.1 سازمان یافته است (۳۳). در اکثر مطالعات گزارش شده است که miR-497 دارای یک فعالیت سرکوبگر تومور و تنظیم‌کننده مسیرهای متعددی که در تکثیر سلولی، مهاجرت، حمله و رگ زایی دخیل است (۲۵). در مطالعه ای غلظت miR-497 به طور قابل توجهی در سرم بیماران بدخیمی آستروسیتوما در مقایسه با کنترل های نرمال کاهش یافته است (۲۵). miR-497 یکی از miRNA ها است که به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و miRNA سرکوب کننده تومور در استئوسارکوم، سرطان روده بزرگ، گلیوم، سرطان پستان و چندین نوع سرطان دیگر در نظر گرفته می‌شود که در تنظیم رشد سلول‌های توموری، مهاجرت، تهاجم و مقاومت به شیمیایی نقش دارد (۳۴). miR-497 در بافت سرطان ریه سلول غیر کوچک یا NSCLC کاهش بیان نسبت به بافت نرمال دارد (۱۳). miR-497 در بافت‌ها و سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور و سلول‌های طبیعی کاهش یافته است (۴۱) همچنین نتایج نشان داد که یک هدف درمانی بالقوه و نشانگر زیستی برای سرطان پستان است (۴۱). اخیراً نشان داده شده است که عدم تنظیم miRNA ها به توسعه GBM کمک می‌کند (۳۶). miR-497 فعال سازی مسیر PI3K/Akt را تنظیم می‌کند (۷). همچنین محققین نشان دادند که miR-497 می‌تواند در سلول های سرطانی معده، ریه (۴۲) و روده بزرگ نقش

بیماران افزایش بیان نسبت به ژن‌های دیگر داشت (۲۴). تجزیه و تحلیل ژنتیکی اخیر نشان داد که بیان SCAMP5 در بیمار مبتلا به اوتیسم پراکنده ایدیوپاتیک، به ۴۰ درصد کاهش می‌یابد (۲۳). با استفاده از آنالیز نتایج دیتابیس‌های مختلف بیان SCAMP5 در گلیوبلاستوما مولتی فرم در مقایسه با بافت نرمال مغز انسان کاهش یافته است (۴)، این ژن از ژن‌های سرکوبگر تومور بالقوه گلیال می‌باشد (۴). بیان ژن SCAMP5 در گلیوبلاستوما مولتی فرم نسبت به نمونه نرمال کاهشی می‌باشد (۱۷). با بررسی پیش آگهی بقاء یکسری ژن ها در گلیوبلاستوما استفاده از خصوصیات تکاملی شبکه های ژنی متوجه شدند که SCAMP5 به احتمال زیاد آنکوژن می‌باشد (۳۵). در سرطان پروستات بین hsa-mir-93-5p و SCAMP5 برهم کنش وجود دارد (۳۷). محققین با استفاده از ترنسکرپتومیکس متا آنالیز و sDEGs (significantly Differentially Expressed Genes) ارتباط های مولکولی در GBM، AD و LC بررسی کردند و نشان دادند که "فسفوریلاسیون اکسیداتیو" در AD و GBM down regulate و در LC up regulate تنظیم می‌شود، همچنین بیان ژن های مختلفی را بررسی کردند از جمله SCAMP5 که در AD و GBM down regulate و در LC up regulate می‌باشد و براساس این مطالعه این ژن می‌تواند کاندید مناسبی برای بررسی مکانیسم های مولکولی در این سه بیماری باشد (۲۶). SCAMP5 به وضوح در مغز بیماران مبتلا به بیماری هانتینگتون افزایش یافته است (۲۰). SCAMP5 یکی از ژن‌های دخیل در اختلال اوتیسم می‌باشد (۱). در این مطالعه miR هدف در گیر در ژن SCAMP5 مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه و تحلیل KEEG

بیان کرد که ژن *SCAMP5* می‌تواند، به عنوان یک بیومارکر پیشنهادی برای تشخیص سرطان GBM استفاده شود اما نیازمند بررسی بیشتر این ژن علاوه بر استفاده از Real-time PCR با یکی از روش‌های سنجش میزان پروتئین همچون، فلوسایتومتری و وسترن بلات می‌باشد. در واقع یافتن یک مارکر مولکولی در کنار داده‌های پاتولوژی، به شناسایی گلیوبلاستوما مولتی فرم کمک شایانی می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و دانشگاه علوم پزشکی زنجان (زنجان، ایران) و کلیه بیمارانی که در این مطالعه شرکت کرده‌اند، تشکر می‌کنند.

منابع

1. Bijl N., Thys C., De la Marche W., Devriendt K., Peeters H., Van Geet C., Freson K., 2015. Platelet studies in autism spectrum disorder patients and first-degree relatives. *Molecular autism*, 6(1): 1-10.
2. Castermans D., Volders K., Crepel A., Backx L., De Vos R., Freson K., Meulemans S., Vermeesch JR., Schrandt-Stumpel CT., De Rijk P., Del-Favero J., 2010. *SCAMP5*, *NBEA* and *AMISYN*: three candidate genes for autism involved in secretion of large dense-core vesicles. *Human molecular genetics*, 19(7): 1368-1378.
3. Dashti S., Ashouri S., Kheirollahi M., 2015. Expression of *TERRA* in Different Grades of Astrocytoma. *J Isfahan Med Sch*, 32(317): 2333-42. [In Persian]
4. Dmitrenko V.V., Bojko O.I., Shostak K.O., Vitak N.Y., Bukreeva T.V., Rozumenko V.D., Malysheva T.A., Shamayev M.I., Zozulya Y.P., Kavsan V.M., 2007. Characterization of genes, down-regulated in human glioma, potential tumor

داشته باشد (۷). به دلیل عملکرد عالی *miR-497* با $AUC=0.87$ مارکر خوبی می‌باشد (۲۵). *miR-497* در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم، سرطان مثانه، آستروسیتوما، سرطان نازوفارنکس و سرطان پروستات بیان کاهشی در مقایسه با کنترل نرمال داشت (۲۵) و در نئوپلازی روده بزرگ و سرطان دهانه رحم افزایش بیان در مقایسه با نمونه نرمال داشت (۲۵).

در حالی که در مطالعه ما بیان ژن *SCAMP5* در بافت توموری بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما به مراتب کمتر از بافت سالم اطراف تومور بیان شده‌اند، ما با توجه به مطالعه ی محققان دیگر انتظار کاهش بیان را در ژن *SCAMP5* در نمونه‌های بافت گلیوبلاستوما مولتی فرم داشتیم و همینطور میزان بیان با سن بیماران ارتباط داشته باشد که در این مطالعه در بیمارانی با سن بیشتر از ۵۰ سال میزان بیان ژن *SCAMP5* کاهش یافت. بین بیان ژن *SCAMP5* و سن بیماران از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود داشت. همچنین بیان ژن *SCAMP5* در نمونه‌های بیمار نسبت به نمونه‌های سالم از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود داشت و کاهش بیان را نشان داد. با بررسی منحنی ROC ژن مورد مطالعه و با توجه به نتایج AUC و Cut-off ژن *SCAMP5* مشخص گردید که میزان بیان این ژن به خوبی در نمونه‌های بافت سالم و بیمار قابل تشخیص است و *SCAMP5* می‌تواند دارای ارزش بیومارکری باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر کاهش بیان ژن *SCAMP5* در گلیوبلاستوما مولتی فرم صورت گرفته این احتمال را بوجود می‌آورد که کاهش بیان این ژن شاید یکی از ابتدایی‌ترین رویدادهای تشکیل گلیوبلاستوما مولتی فرم در افراد مستعد باشد. همچنین با توجه به نتایج می‌توان

- from the red sea bream (*Pagrus major*). *Data in Brief*, 25: 103901.
12. Holland EC., 2000. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12): 6242-6244.
13. Huang Q., Li H., Dai X., Zhao D., Guan B., Xia W., 2019. miR-497 inhibits the proliferation and migration of A549 non-small-cell lung cancer cells by targeting FGFR1. *Molecular Medicine Reports*, 20(4): 3959-3967.
14. Jiao X., Morleo M., Nigro V., Torella A., D'Arrigo S., Ciaccio C., Pantaleoni C., Gong P., Grand K., Sanchez-Lara PA., Krier J., 2020. Identification of an identical de novo SCAMP5 missense variant in four unrelated patients with seizures and severe neurodevelopmental delay. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 1-8.
15. Jonas S., Izaurralde E., 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews of Genetics*, 16(7): 421-433.
16. Kanehisa M., Goto S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1):27-30.
17. Leone P.E., González M.B., Elosua C., Gómez-Moreta J.A., Lumbreras E., Robledo C., Santos-Briz A., Valero J.M., de la Guardia R.D., Gutiérrez N.C., Hernández J.M., 2012. Integration of global spectral karyotyping, CGH arrays, and expression arrays reveals important genes in the pathogenesis of glioblastoma multiforme. *Annals of Surgical Oncology*, 19(7): 2367-2379.
18. LI S., Guo W., Gao Y., Liu Y., 2015, Ginsenoside Rh2 inhibits growth of glioblastoma multiforme through mTor. *Tumor Biology*, 36(4): 2607-2612.
- suppressor genes. *Biopolymers and Cell*, 23(4): 347.
5. Gaudet P., Livstone MS., Lewis SE., Thomas PD., 2011. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5): 449-462.
6. Guan N., Huo X., Zhang Z., Zhang S., Luo J., Guo W., 2015. Ginsenoside Rh2 inhibits metastasis of glioblastoma multiforme through Akt-regulated MMP13. *Tumor Biology*, 36(9): 6789-6795.
7. Guo ST., Jiang CC., Wang GP., Li YP., Wang CY., Guo XY., Yang RH., Feng Y., Wang FH., Tseng H.Y., Thorne R.F., 2013. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene*, 32(15): 1910-1920.
8. Han C., Chen T., Yang M., Li N., Liu H., Cao X., 2009. Human SCAMP5, a novel secretory carrier membrane protein, facilitates calcium-triggered cytokine secretion by interaction with SNARE machinery. *The Journal of Immunology*, 182(5): 2986-2996.
9. Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi SM., Simjee SU., 2017. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1): 3.
10. Hassani L., Asaadi Tehrani G., Mirza Ahmadi S., 2018. Relationship between LncRNA THRIL expression controlling TNF-alpha pathway in glioblastoma cell line under temozolomide treatment. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*, 76(7): 469-476. [In Persian]
11. Heo MJ., Kim A., Park C.I., 2019. Data on molecular characterization and gene expression analysis of secretory carrier-associated membrane protein 5 (SCAMP5)

26. Sánchez-Valle J, Tejero H, Ibáñez K, Portero J.L, Krallinger M, Al-Shahrour F, Tabarés-Seisdedos R, Baudot A, Valencia A., 2017. A molecular hypothesis to explain direct and inverse co-morbidities between Alzheimer 's disease, Glioblastoma and Lung cancer. *Scientific Reports*, 7(1): 1-12.
27. Shabani M., Mohammad Ganji S., Salahshouri Far I., 2020. Investigation of Long Non-coding RNA *HOX A11-AS* Expression in Iranian Patients with Glioblastoma: A Quantitative Study. *Journal of Qom University of Medical Science*, 14(5):22-29. [In Persian]
28. Shahsavani N., Mazaheri M., 2017. The Effect of Resveratrol on Expression of microRNA34a in U87MG Cancerous Cells Line. *Journal of Isfahan Medical School*, 35(429): 525-30. [In Persian]
29. Shen L., Lin Y., Sun Z., Yuan X., Chen L., Shen B., 2016. Knowledge-guided bioinformatics model for identifying autism spectrum disorder diagnostic MicroRNA biomarkers. *Scientific reports*, 6(1): 1-9.
30. Sherman BT., Lempicki RA., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1): 44-57.
31. Stigbrand T., 2016. Ginsenoside Rh2 inhibits invasiveness of glioblastoma through modulation of VEGF-A. *Tumor Biol*, 37:15477-15482.
32. Tabuchi S., 2015. The autotaxin-lysophosphatidic acid-lysophosphatidic acid receptor cascade: proposal of a novel potential therapeutic target for treating glioblastoma multiforme. *Lipids in health and disease*, 14(1): 1-9.
33. The human gene database. Gene cards.2021.availablefrom;<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCAMP5&keywords=SCAMP5>.
19. Lin P.J., Williams W.P., Luu Y., Molday R.S., Orłowski J., Numata M., 2005. Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7. *Journal of Cell Science*, 1; 118(9):1885-97.
20. Liu C., Su C., 2019. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics*, 9(4): 1015.
21. Luo Y., Bao X., Zheng S., Gu T., Mao S., Liu S., Sun J., Huang M., Zhang L., 2020. A potential risk factor of essential hypertension in case-control study: MicroRNAs miR-10a-5p. *Clinical and Experimental Hypertension*, 42(1): 36-42.
22. Noh JY., Lee H., Song S., Kim NS., Im W., Kim M., Seo H., Chung CW., Chang JW., Ferrante R.J., Yoo Y.J., 2009. SCAMP5 links endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17): 11318-11325.
23. Park D., Lee U., Cho E., Zhao H., Kim JA., Lee BJ., Regan P., Ho WK., Cho K., Chang S., 2018. Impairment of release site clearance within the active zone by reduced SCAMP5 expression causes short-term depression of synaptic release. *Cell reports*, 22(12): 3339-3350.
24. Qian T., Cheng Z., Quan L., Zeng T., Cui L., Liu Y., Si C., Huang W., Dai Y., Chen J., Liu L., 2020. Prognostic role of SCAMP family in acute myeloid leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, 20(4):595-600.
25. Regazzo G., Terrenato I., Spagnuolo M., Carosi M., Cognetti G., Cicchillitti L., Sperati F., Villani V., Carapella C., Piaggio G., Pelosi A., 2016. A restricted signature of serum miRNAs distinguishes glioblastoma from lower grade gliomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1): 124.

- secretion of α -synuclein via exosome. *PLoS One*, 12(7): e0180892.
39. Zhao H., Kim Y., Park J., Park D., Lee SE., Chang I., Chang S., 2014. SCAMP5 plays a critical role in synaptic vesicle endocytosis during high neuronal activity. *Journal of Neuroscience*, 34(30): 10085-10095.
40. Zheng JC., Tham CT., Keatings K., Fan S., Liou AY., Numata Y., Allan D., Numata M., 2014. Secretory carrier membrane protein (SCAMP) deficiency influences behavior of adult flies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2: 64.
41. Zhong H., Yang J., Zhang B., Wang X., Pei L., Zhang L., Lin Z., Wang Y., Wang C., 2018. LncRNA GACAT3 predicts poor prognosis and promotes cell proliferation in breast cancer through regulation of miR-497/CCND2. *Cancer Biomarkers*, 22(4): 787-797.
42. Zhu W., Zhu D., Lu S., Wang T., Wang J., Jiang B., Shu Y., Liu P., 2012. miR-497 modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2. *Medical Oncology*, 29(1): 384-391.
34. Tian F., Zhan Y., Zhu W., Li J., Tang M., Chen X., Jiang J., 2019. MicroRNA-497 inhibits multiple myeloma growth and increases susceptibility to bortezomib by targeting Bcl-2 Corrigendum in/10.3892/ijmm. 2019.4297. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(2): 1058-1066.
35. Upton A., Arvanitis TN., 2012. Investigating survival prognosis of glioblastoma using evolutionary properties of gene networks. In 2012 IEEE 12th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), pp: 466-471.
36. Xu F., Li F., Zhang W., Jia P., 2015. Growth of glioblastoma is inhibited by miR-133-mediated EGFR suppression. *Tumor Biology*, 36(12): 9553-9558.
37. Xu N., Wu YP., Yin HB., Xue XY., Gou X., 2018. Molecular network-based identification of competing endogenous RNAs and mRNA signatures that predict survival in prostate cancer. *Journal of Translational Medicine*, 16(1): 274.
38. Yang Y., Qin M., Bao P., Xu W., Xu J., 2017. Secretory carrier membrane protein 5 is an autophagy inhibitor that promotes the

Evaluation of SCAMP5 Gene Expression and Its Target miR in the Tissue of Patients with Glioblastoma Multiforme

Nasrin Karimi¹, Hamidreza Kheiri Manjilli², Vajiheh Zarrinpour^{1*},
Mohammadmahdi Forghanifard¹

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
2. Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Abstract

Glioblastoma multiforme is one of the most malignant and common brain tumors, and after current combination therapy, patient survival is relatively poor and the disease is always fatal. This study was aimed at investigating the expression of *SCAMP5* as a possible biomarker in GBM and evaluating the target miR of this gene. 50 tissue samples with GBM form before treatment and 50 healthy tissue samples from the GBM tumor margin were collected as a control. RNA extraction and cDNA synthesis were performed for all samples. Subsequently, a specific primer was designed and the expression of *SCAMP5* gene was examined using Real-time PCR. *ACTB* gene was used as the internal control. Statistical analysis was carried out using Graphpad Prism software version 8. Roc curve was used to evaluate the biomarker value of *SCAMP5* gene. Decreased expression of *SCAMP5* gene was observed in GBM samples and its expression was compared with the pathological characteristics of patients. Expression of *SCAMP5* gene with patients' age with P-value <0.05 was statistically significant. However, the expression of this gene with patients' gender with P-value > 0.05 was not statistically significant. *SCAMP5* was expressed in tumor tissue of patients with GBM much lower than healthy tissue around the tumor. The results revealed that *SCAMP5* expression decreased in patients older than 50 years. ROC curve showed that the *SCAMP5* gene could have a biomarker value. According to this study, it may be possible to use the expression of this gene as a marker as an early diagnostic method.

Keywords: *SCAMP5*, Glioblastoma Multiforme, Real-time PCR, Biomarker