

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات بیان LncRNA SNHG15 در بافت بیماران گلیوبلاستوما مولتی‌فرم با روش
Real Time PCRسحر شاکری یکتا^۱، الهام مسلمی^{۲*}، سویار ساری^۱، فاطمه روح‌اله^۱، حمیدرضا خیری^۳

۱- گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

۲- گروه علوم سلولی و مولکولی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

*مسئول مکاتبات: emoslemi@iauet.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱

DOI: 10.22034/ascij.2022.1970970.1439

چکیده

گلیوبلاستوما یک تومور بدخیم تهاجمی مغز و نخاع است. شواهد متعدد نقش انکوژنی مولکول‌های RNA طولانی غیرکدکننده (lncRNA) را در طیف گسترده‌ای از انواع سرطان‌ها از جمله گلیوما نشان می‌دهد و بسیار مهم است، با این حال، عملکرد تومورزایی lncRNA در گلیوم تا حد زیادی نامشخص است. شواهد فزاینده نشان داده که lncRNA ها از جمله SNHG15، نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های انسانی، به ویژه در پاتوژنز و پیشرفت سرطان‌ها دارند. در این مطالعه ۲۵ بلوک بافت پارافینه مبتلایان به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم و بافت حاشیه توموری جمع‌آوری و استخراج RNA انجام شد. سنتز cDNA و بررسی بیان SNHG15 با تکنیک Real Time PCR انجام گرفت. منحنی ROC جهت بررسی ارزش بیومارکری رسم و تجزیه و تحلیل آماری توسط GraphPad Prism v.8.0.1 انجام شد. افزایش بیان بالای SNHG15 در نمونه بافت افراد بیمار نسبت به بافت حاشیه توموری به ثبت رسید ($p < 0.0001$) ارتباط معناداری در بیان این ژن، در بیماران با سنین بیش از ۵۰ سال و کمتر از ۵۰ سال ($p = 0.7573$)، در لوب‌های پیشانی، گیجگاهی، آهیانه، پس سری ($p = 0.9802$)، بقا در بیش از ۱۲ ماه و کمتر از ۱۲ ماه ($p = 0.5007$) مشاهده نشد و فقط در جنسیت زن و مرد ارتباط معنادار به ثبت رسید ($p = 0.0001$). بیان LncRNA SNHG15 در بافت توموری بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بیشتر از بافت حاشیه توموری به ثبت رسید. با بررسی منحنی ROC این احتمال می‌رود که LncRNA SNHG15 بتواند به عنوان مارکر زیستی مطرح شود اما نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: SNHG15، گلیوبلاستوما مولتی‌فرم، Real-Time PCR، LncRNA، بیان ژن.

مقدمه

انواع اصلی آن عبارتند از: گلیوبلاستوما، آستروسیتوم، گلیوم مختلط، آستروسیتوم آناپلاستیک، اپاندیوموم و الیگودندروگلیوما. در این میان، گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM) درجه IV خطرناک‌ترین نوع گلیوما با نرخ

بدخیم‌ترین تومور اولیه مغزی گلیوما است که بر سلول‌های گلیال سیستم عصبی مرکزی (CNS) تأثیر می‌گذارد (۱۶). انواع مختلفی از گلیوما بر اساس سلول‌هایی که از آنها منشأ می‌گیرد شناخته شده است.

بقای تنها ۳ تا ۵ درصد است (۱۷). به طور کلی، یک بیمار مبتلا به GBM تا پنج ماه زنده می‌ماند. با این حال، جراحی مدرن، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌تواند میانگین بقا را تا حدود ۱۲ ماه افزایش دهد (۳). به دلیل وجود غشاهای پلاسمایی مجرا و آبلومینال سلول‌های اندوتلیال، سد خونی مغزی موانع فیزیکی و بیوشیمیایی را برای مغز طبیعی ایجاد و عبور داروهای انکولوژیک، مولکول‌های چربی دوست و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جلوگیری می‌کنند (۲۰). GBM باعث ایجاد ادم و اوزونیک مغز که منجر به فشار داخل جمجمه و در نهایت منجر به القای نشت و اختلال در سد خونی مغزی طبیعی در اکثر بیماران می‌شود. چالش اصلی در پیش‌آگهی و درمان GBM، به دلیل ماهیت تهاجمی آنها و غیرقابل دسترس بودن بافت‌های مغز ناشی از مختل شدن سد خونی مغزی است (۶).

تنها حدود ۵ درصد از بیماران GBM بیش از ۵ سال پس از تشخیص زنده می‌مانند (۱۲). عود تومورهای GBM یک عامل اصلی محدودکننده برای تمام استراتژی‌های درمان اولیه است (۲۱) و وقوع این بیماری در مغز، تشخیص در مراحل اولیه را بسیار دشوارتر می‌کند. یکی از عوامل اصلی کمک‌کننده به بدخیمی GBM مقاومت در برابر درمان‌های سنتی و پیشبرد درمان‌های هدفمند است. RNAهای طولانی غیرکدکننده (lncRNAs) دسته‌ای از ncRNA ها با طول بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند و درصد بسیار بالایی (۸۰ درصد) از رونوشت‌های انسانی را تشکیل می‌دهند (۲۳).

شواهد اخیر نشان می‌دهد که lncRNAها به عنوان تنظیم‌کننده‌های حیاتی در فرآیندهای بیولوژیکی مختلف، مانند رشد سلولی، چرخه سلولی، آپوپتوز سلولی، تمایز سلولی، تهاجم سلولی و متاستاز

شناسایی می‌شوند (۸، ۹).

تحقیقات محققین نشان داده است که lncRNAها می‌توانند به عنوان یک تنظیم‌کننده رونویسی، پردازشگر پس از رونویسی، بازسازی‌کننده کروماتین در تومورزایی و پیشرفت، عمل کنند (۲۳).

جالب توجه است که lncRNAها روش جدیدی برای تنظیم بیان ژن در سطوح رونویسی، پس از رونویسی و اپی‌ژنتیک ارائه می‌دهند (۲۲). علاوه بر این، lncRNAها می‌توانند انواع شبکه‌های سیگنال‌دهی مرتبط با سرطان را از طریق تعامل با پروتئین، مانند مسیر سیگنالینگ wnt/ β -catenin، مسیر سیگنال‌دهی انتقال اپیتلیال به مزانشیمی (EMT)، مسیر سیگنال‌دهی NF-kB تنظیم کنند (۵).

اخیراً یک lncRNA به نام SNHG15 توجه زیادی را به خود جلب کرده است. تحقیقات نشان داده است که افزایش SNHG15 با عملکردهای تومورزایی از جمله تکثیر و متاستاز در انواع سرطان از جمله ریه (۱۱)، پستان (۲۵) و کبد (۱۴) مرتبط است. در حالی که گزارش‌های دیگر عملکرد سرکوب‌کننده تومور SNHG15 را نشان دادند (۱۰، ۲۴).

در اکثر سرطان‌ها افزایش بیان lncSNHG15 به ثبت رسیده است. افزایش بیان در سرطان روده بزرگ، سرطان معده، سرطان پروستات، سرطان کارسینوم سلول‌های کبدی و سرطان ریه که افزایش بیان SNHG15 با تمام پارامترهای بالینی آسیب‌شناسی ارتباط مستقیم داشت، در سرطان پانکراس افزایش بیان با تمام پارامترها به جز اندازه تومور (۲۳) و در سرطان پستان به جز سن (بیش از ۶۰ سال ۲۳ نمونه و کمتر از ۶۰ سال ۳۵ نمونه) (۲۵) ارتباط مستقیم و معنی‌دار به ثبت رسیده است. در سرطان تیروئید دو تحقیق متفاوت مشاهده شد، در سال ۲۰۱۸ کاهش بیان SNHG15 در بافت PTC در مقایسه با سلول‌های تیروئید طبیعی به ثبت رسید (۲۴)، در حالی که در

شد.

استخراج RNA: RNA از بافت‌های گلیوبلاستوما مولتی‌فرم و حاشیه تومور طبق دستورالعمل کیت High Pure RNA Paraffin kit (Roche, Germany) استخراج و غلظت RNA با استفاده از NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) اندازه‌گیری و صحت آن با استفاده از الکتروفورز ژل ۲ درصد تأیید گردید. جهت کاهش آلودگی‌های احتمالی از Ambion DNase I (RNase-free) (Ambion, Austin, TX, USA) استفاده شد.

سنتز cDNA: سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت PrimeScript 1st strand cDNA Takara (Synthesis Kit, US) جهت انجام واکنش رونویسی معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. از ژن *ACTB* به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. پرایمر مورد نیاز برای *SNHG15* و *ACTB* با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner Version 6.5.52 Beta طراحی و برای اطمینان از صحت آنان از Primer Blast, Oligo7, IDT استفاده شد، سپس به شرکت سازنده Metabion international AG (Steinkirchen, Germany) سفارش داده شد و کارایی جفت پرایمر توسط نرم‌افزار LinRegPCR (12. x) (AMC, Amsterdam, The Netherlands) تعیین شد. توالی پرایمرهای ژن *SNHG15* و *ACTB* در جدول آورده شده است.

(جدول ۱) جهت بررسی تغییرات بیان *ACTB* و *SNHG15* بر روی نمونه‌های بافت توموری و حاشیه بافت توموری از دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) استفاده شد و منحنی‌های تکثیر و ذوب به وسیله دستگاه رسم شد. در مرحله Real-Time PCR این روش ابتدا مخلوط تکثیر در حجم ۲۰ μl تهیه شد و از RT² SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, Germany) استفاده شد. واکنش نمونه‌های مورد نظر

همین رده سلولی TC در سال ۲۰۱۹ افزایش بیان *SNHG15* به ثبت رسیده است (۱۰).

با این حال، نقش بالقوه *SNHG15* در تومورزایی GBM به طور کامل بررسی نشده است. با توجه به اطلاعات به دست آمده در تحقیقات گذشته محققین، این ژن کاندید مناسبی برای بررسی عملکرد بر روی گلیوبلاستوما است. در مطالعه حاضر هدف بررسی بیان lncRNA ارزشمند *SNHG15* در سرطان گلیوبلاستوما با استفاده از روش qRT-PCR در جمعیت ایران است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه موردی، ۲۵ نمونه از بافت GBM و ۲۵ نمونه از بافت حاشیه تومور همان افراد قبل از درمان پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی و تأیید قسمت توموری و غیرتوموری توسط پاتولوژیست، جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در بازه سنی ۲۵ تا ۸۰ سال بودند، اولین درمان تمام بیماران جراحی بود و هیچ سابقه ژنتیکی در زمینه سرطان گلیوبلاستوما مولتی‌فرم نداشتند. نمونه‌های پarafین شده با فرمالین ثابت Paraffin Removal Solution (biotechrabbit, Germany) (FFPE) از بیماران گلیوبلاستوما که در انستیتو سرطان امام خمینی تهران، بستری شده بودند، تهیه شد. کمیته اخلاق دانشکده داروسازی و علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران (شناسه اخلاق، IR.IAU.PS.1398.237) پروتکل مطالعه را تصویب کرد. کلیه اهداکنندگان داوطلبانه رضایت آگاهانه کتبی خود را قبل از نمونه‌گیری اعلام کردند.

پارافین‌زدایی: در ابتدا بلوک‌های FFPE برش و RNA کل با استفاده از معرف‌های TRIZoL (Invitrogen, VIC, Australia) استخراج و در نهایت جهت حذف و یا حل شدن پارافین، شستشو با زایلن ۳ بار تکرار

شد و از کمی‌سنجی نسبی (Relative Quantification (RQ) برای بررسی تغییرات بیان استفاده شد. در این مطالعه RQها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (SD) بیان می‌شوند. تجزیه و تحلیل آماری برای تشخیص تفاوت بین گروه‌ها در متغیرهای جنسیت، سن و بقا با استفاده از آزمون t و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. برای متغیرهایی که توزیع طبیعی نداشتند از آزمون Man-Whitney در متغیر بافت توموری و بافت حاشیه توموری و Kruskal-Wallis در متغیر جایگاه تومور استفاده شد تا اختلافات آماری معنی‌دار را نشان دهد ($p \leq 0/05$).

از منحنی ROC برای ارزیابی حساسیت و اختصاصیت LncRNA SNHG15 به عنوان مارکر زیستی در نمونه بافت توموری GBM و بافت حاشیه تومور GBM استفاده شد.

طی سیکل ۳ مرحله‌ای و در ۴۰ چرخه به صورت زیر انجام گرفت: سیکل اول: مرحله Activation در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سیکل دوم: دو رشته در مرحله Denaturation و دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه از هم جدا شدند، سیکل سوم: در پایان مرحله Primer annealing و Extention در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد (۲).

آنالیز آماری: جهت آنالیز میزان بیان Lnc مورد مطالعه از Real-Time PCR System Step One و جهت آنالیز آماری از GraphPad Prism V.8.0.1 (Graph Pad Software Inc, CA, USA) استفاده شد. در تکنیک Real-time PCR پس از انجام واکنش تکثیر، Ct (Cycle threshold) نمونه‌ها توسط دستگاه بدست آمد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از مقایسه و تجزیه و تحلیل CT نمونه‌ها و با روش $\Delta\Delta Ct$ انجام

جدول ۱- توالی پرایمر اختصاصی طراحی شده ژن SNHG15 و ACTB

نام ژن	پرایمرها	(۳'>۵') توالی	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)	طول قطعه حاصل از تکثیر
SNHG15	Forward	GTCTTCGGCAGTCTAGTCATC	۵۷/۹۳	۱۱۰ جفت باز
	Reverse	CTCTTCCACTTTGAGACCGTC	۵۸/۳۲	
ACTB	Forward	ATGTACGTTGCTATCCAGGC	۵۷/۷۶	۷۰ جفت باز
	Reverse	AGTCCATCACGATGCCAG	۵۶/۷۳	

نتایج

تائیدی بر اتصال صحیح پرایمرها به LncRNA SNHG15 و محصول PCR دقیقاً برای ژن مورد نظر است. برای محاسبه کارایی پرایمر، رقت‌های سریالی ۵ برابری نمونه‌های cDNA تهیه شد و منحنی‌های استاندارد مورد بهره‌برداری قرار گرفتند. برای این منظور، شیب منحنی استاندارد با استفاده از این معادله اندازه‌گیری شد: $E = 10(-1/\text{slope})$. راندمان تقویت SNHG15 و کنترل داخلی ACTB با یک همبستگی

در ابتدا منحنی ذوب و تکثیر LncRNA SNHG15 به صورت جداگانه توسط دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و رنگ فلورسانس سایبرگرین که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است و اطمینان از تکثیر قطعه‌های اختصاصی و بررسی نبود قطعه‌های غیراختصاصی در محصول PCR. رسم گردید (شکل ۱- الف و ب). این امر

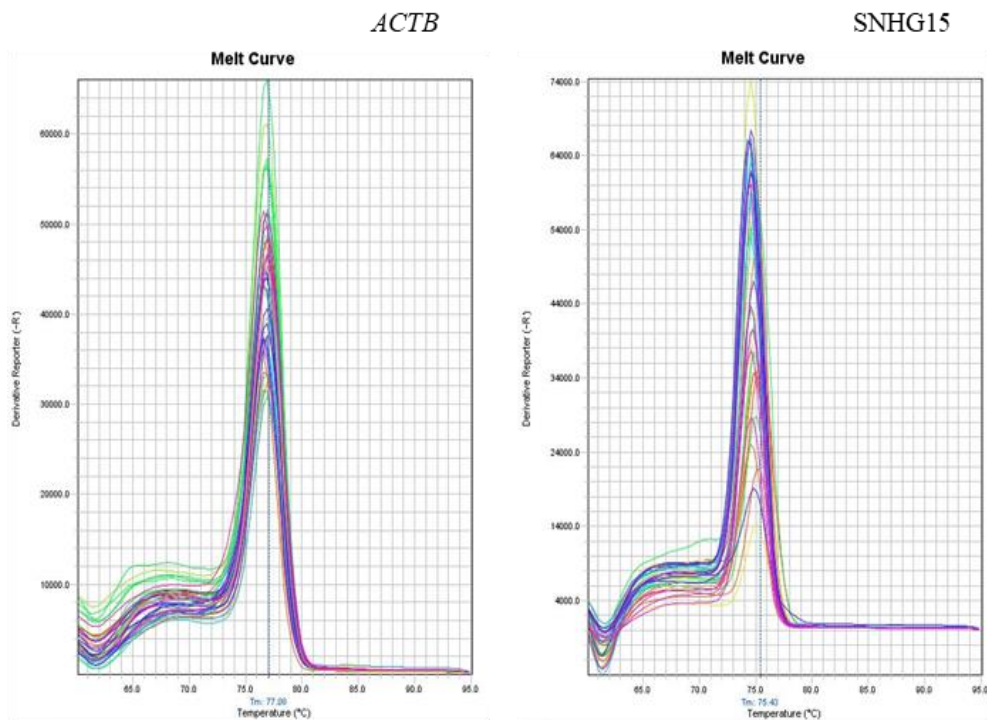
مشاهده نشد ($p=0/6573$) (شکل ۲. ب و ج). در بررسی جایگاه تومور GBM با آزمون Kruskal-Wallis نیز ارتباط معنی داری مشاهده نشد ($0/9802$). $p=$ (شکل ۲. د). پس از بررسی میزان بقا در نمونه‌های جمع آوری شده هیچ اختلاف معناداری از نظر آماری مشاهده نشد ($p=0/5007$) (شکل ۲. ه). جهت ارزیابی بیومارکری LncRNA SNHG15 منحنی AUC-ROC را تجزیه و تحلیل کردیم که به نوبه خود نشان داد SNHG15 به طور بالقوه یک نشانگر زیستی تشخیصی برای گلیوبلاستوما مولتی‌فرم است. سطح زیرمنحنی $AUC = 0/98$ ، $Cut-off = 0/0622$ ، حساسیت $0/88$ و اختصاصیت 1 به دست آمد (شکل ۳).

خطی بالا برابر بود که اعتبار سنجش را برجسته می‌کند. سپس بررسی بیان LncRNA SNHG15 با ویژگی‌های بالینی آسیب‌شناسی بیماران گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (سن، جنس، محل تومور و میزان بقا) که در جدول ۲ ارائه شده است به صورت آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. (شکل ۲. الف. ه) نتایج بیان SNHG15 در نمونه بیماران GBM و نمونه حاشیه تومور مورد بررسی قرار گرفت و افزایش بیان معنادار ($p < 0/0001$) مشاهده شد (شکل ۲. الف). سپس به بررسی بیان در جنسیت و سن با آزمون T-Test پرداخته شد. در جنسیت ارتباط معنی دار در بین نمونه زنان و مردان مشاهده شد ($p = 0/0001$)، در حالی که هیچ ارتباط معناداری بین سن نمونه‌ها

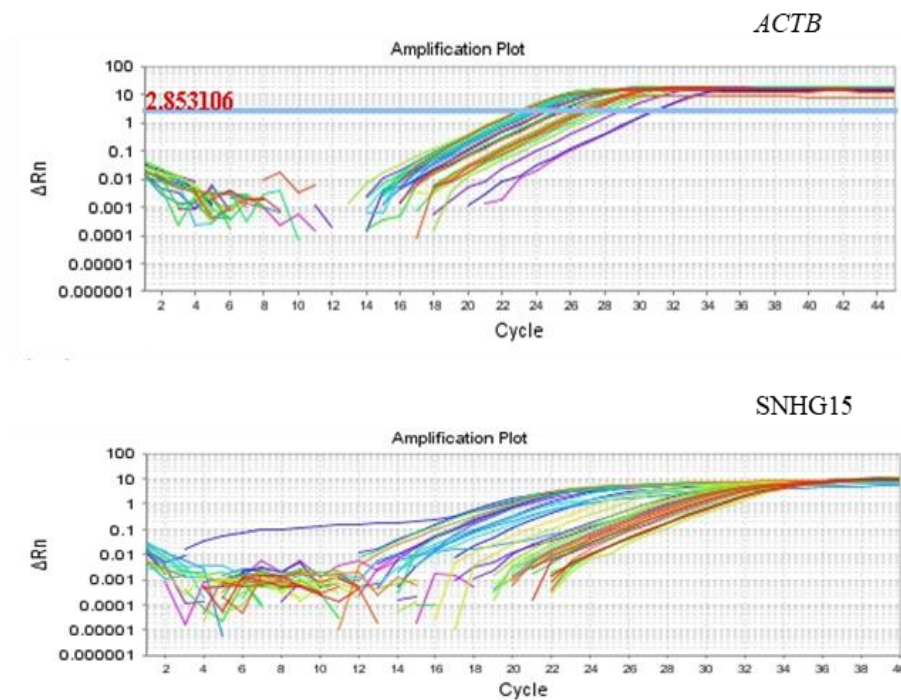
جدول ۲- مشخصات پاتولوژی نمونه‌ها

ویژگی‌ها	درصد
سن	
< ۵۰ سال	۲۸٪
> ۵۰ سال	۷۲٪
جنس	
مرد	۶۸٪
زن	۳۲٪
جایگاه	
لوب قدامی مغز (پیشانی)	۴۰٪
لوب تمپورال	۳۲٪
لوب جداری	۱۶٪
لوب آهیانه‌ای	۸٪
سایر	۴٪
بقا	
< ۱۲ ماه	۴۴٪
> ۱۲ ماه	۴۶٪

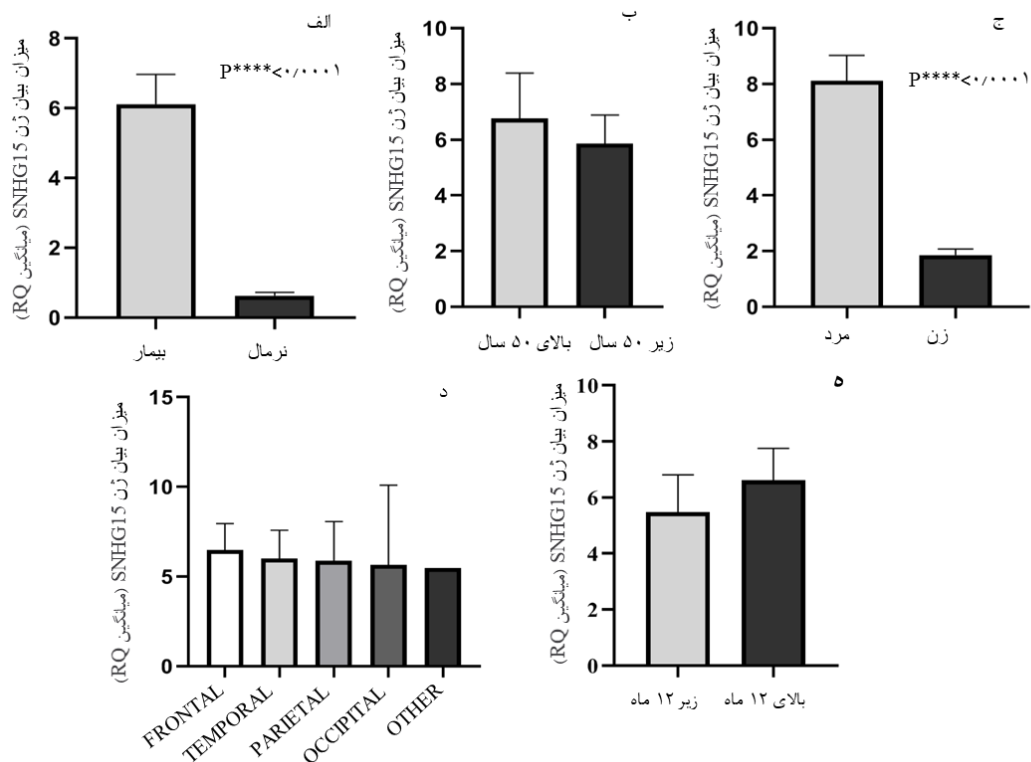
الف



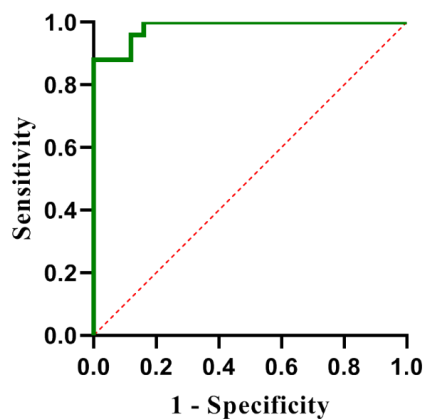
ب



شکل ۱- نمودار منحنی ذوب و تکثیر. (الف) منحنی ذوب *ACTB* و *SNHG15*. (ب) منحنی تکثیر *ACTB* و *SNHG15*



شکل ۲- بررسی بیان LncRNA SNHG15 با ویژگی‌های بالینی آسیب‌شناسی بیماران GBM. (الف) بررسی بیان در بافت نمونه‌های GBM نسبت به نمونه بافت حاشیه GBM $p < 0.0001$. (ب) بررسی بیان SNHG15 بر اساس سن در بین بیماران GBM $p = 0.6573$. (ج) بررسی بیان SNHG15 بر اساس جنسیت در بین بیماران GBM $p < 0.0001$. (د) بررسی بیان SNHG15 بر اساس جایگاه تومور در بین بیماران GBM $p = 0.9802$. (ه) بررسی بیان SNHG15 بر اساس بقا از زمان تشخیص تا مرگ در بین بیماران GBM $p = 0.5007$. p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد و با * نشان داده شد. ** نشان‌دهنده $p < 0.01$ ، *** نشان‌دهنده $p < 0.001$ و **** نشانگر $p < 0.0001$ است.



شکل ۳- بررسی منحنی ROC بافت نمونه‌های GBM نسبت به نمونه بافت حاشیه GBM در LncRNA SNHG15

بحث

جهت مبارزه با این بیماری کشنده وجود ندارد. علیرغم پیشرفت در توسعه عوامل شیمی درمانی از

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم یکی از بدخیم‌ترین نوع سرطان است و در حال حاضر هیچ راهکار موثری

Real Time PCR پرداخته شد. نتایج بررسی نشان داد که بیان این LncRNA در بافت بیماران نسبت به بافت حاشیه تومور افزایش معنادار پیدا کرده است. در رابطه با بررسی بیان بر روی گلیوبلاستوما مولتی‌فرم تحقیقاتی انجام شده است اما در رابطه با بیان LncRNA SNHG15 در ایران اطلاعاتی به ثبت نرسیده است.

سطح بالای تراکم عروق ریز را می‌توان به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی مستقل برای بیماران گلیوما شناسایی کرد (۱۵).

Ma و همکارانش SNHG15 را به عنوان یک lncRNA جدید درگیر در رشد سلول‌های اندوتلیال میکروواسکولار گلیوما شناسایی کردند. مطالعه آنها نشان داد که SNHG15 به طور قابل‌توجهی در سلول‌های اندوتلیال ریز عروقی مغز انسان (hCMECs) با واسطه گلیوم افزایش یافته است.

همچنین آنها نشان دادند که کاهش بیان SNHG15 می‌تواند ظرفیت تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال عروق گلیوما را سرکوب کند (۱۸). جالب توجه است، طی تحقیقاتی نشان دادند ناک داون کردن SNHG15 می‌تواند مهار VEGFA و Cdc42 را القا کند، و باعث افزایش فعال شدن رگرایی شود (۱۳)، (۱۸). در سال ۲۰۱۹، Li و همکارانش با بررسی IncSNHG15 و مشاهده افزایش بیان و نقش تومورزایی و همچنین نقش بالقوه این LNC را در مقاومت دارویی گزارش کردند (۱۳). در این تحقیق افزایش بیان IncSNHG15 در بافت نمونه‌های GBM نسبت به نمونه بافت حاشیه GBM مشاهده شد ($p < 0/0001$).

نتیجه‌گیری

با مقایسه بیان SNHG15 بافت نمونه‌های بیمار GBM و بافت حاشیه تومور این افراد مشخص گردید سطح

جمله عوامل درمانی هدفمند، زمان بقای کلی اغلب از دو سال پس از تشخیص فراتر نمی‌رود (۴، ۱۹).

در حال حاضر، گزینه‌های درمانی برای GBM شامل جراحی به تنهایی یا رادیوشیمی درمانی کمکی در ترکیب با جراحی بافت است (۱).

برداشتن بافت با جراحی بی اثر است زیرا سلول‌های سرطانی ممکن است به بافت‌های اطراف نفوذ کرده یا متاستاز داده باشند. علاوه بر این، به دلیل احتمال عوارض جانبی، هنوز قابل بحث است که آیا می‌توان داروهای کمکی سیستمیک را پس از عمل جراحی تجویز کرد (۷). در نتیجه، شناسایی نشانگرهای زیستی برای پیش‌بینی و پیش‌آگهی GBM بسیار مهم است. تحقیقات متعددی نقش حیاتی lncRNAها را در بروز و پیشرفت تومور بیان کرده‌اند. در این تحقیقات مشخص شده است که IncRNA SNHG15 در برخی سرطان‌ها به طور قابل توجهی تنظیم می‌شود و به عنوان یک تنظیم کننده انکوژنیک در توسعه و پیشرفت سرطان عمل می‌کند این در حالی است که در برخی دیگر از سرطان‌ها می‌تواند به عنوان یک سرکوب کننده تومور شناخته شود. این تفاوت را می‌توان تا حدی با ناهمگنی تومور، زمینه‌های مختلف بیان ژن، منابع مختلف نمونه‌های تومور و تعداد محدود نمونه توضیح داد. علاوه بر این، بیان نابجای SNHG15 به طور قابل توجهی با برخی از پارامترهای بالینی در بسیاری از بیماران سرطانی مرتبط است و پتانسیل آن را به عنوان یک نشانگر زیستی موثر برای تشخیص و درمان سرطان نشان می‌دهد. علیرغم رشد تصاعدی در lncRNA، درک ما از مکانیسم تنظیمی lncRNAها هنوز محدود است و اختلافات زیادی در دانش فعلی lncRNA باقی مانده است (۲۳).

از این رو در این تحقیق به بررسی بیان LncRNA SNHG15 در بافت افراد مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم و حاشیه بافت توموری همین افراد با روش

- Zhang Z.L., Fu L. 2018. LncRNA SNHG15 promotes proliferation and migration of lung cancer via targeting microRNA-211-3p. *European Review in Medical Pharmacological Sciences*, 22(20):6838-6844.
6. Dubois L.G., Campanati L., Righy C., D'Andrea-Meira I., Spohr T.C.L., Porto-Carreiro I., Pereira C.M., Balca-Silva J., Kahn S.A., DosSantos M.F., Oliveira M.D.A.R. 2014. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8:418.
7. Gi T., Sato Y., Tokumitsu T., Yamashita A., Moriguchi-Goto S., Takeshima H., Sato S., Asada Y. 2017. Microvascular proliferation of brain metastases mimics glioblastomas in squash cytology. *Cytopathology*, 28(3):228-234.
8. Huang J., Chen Y.X., Zhang B. 2020. IGF2-AS affects the prognosis and metastasis of gastric adenocarcinoma via acting as a ceRNA of miR-503 to regulate SHOX2. *Gastric Cancer*, 23(1):23-38.
9. Huang Y., Xu Y., Lu Y., Zhu S., Guo Y., Sun C., Xu L., Chen X., Zhao Y., Yu B., Yang Y. 2019. lncRNA Gm10451 regulates PTIP to facilitate iPSCs-derived β -like cell differentiation by targeting miR-338-3p as a ceRNA. *Biomaterials*, 216: 119266.
10. Kheiri Manjili H., Ma'mani L., Tavaddod S., Mashhadikhan M., Shafiee A., Naderi-Manesh H. 2016. D, L-sulforaphane loaded Fe₃O₄@ gold core shell nanoparticles: a potential sulforaphane delivery system. *PloS one*, 11(3):0151344.
11. Kong Q., Qiu M. 2018. Long noncoding RNA SNHG15 promotes human breast cancer proliferation, migration and invasion by sponging miR-211-3p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2):1594-1600.
12. Li Q., Aishwarya S., Li J.P., Pan D.X., Shi J.P. 2022. Gene Expression Profiling of بیان LncRNA منتخب به طور قابل توجهی متفاوت است. با توجه به نتایج به دست آمده از نمودار ROC lncSNHG15، سطح زیر منحنی (AUC) که نشانگر دقت در تمایز بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم نسبت به نمونه بافت حاشیه گلیوبلاستوما مولتی‌فرم است و حساسیت و اختصاصیت محاسبه شده و با آنالیز منحنی و تعیین مقدار cut-off برای این بیومارکر، مشخص گردید که مقدار lncSNHG15 می‌تواند به خوبی بین بافت بیماران GBM و بافت حاشیه تومور GBM تفاوت قائل شود. از این رو می‌تواند این ژن پتانسیل بیومارکری داشته باشد اما باید بررسی بیشتری صورت بگیرد. جهت بررسی‌های دقیق‌تر انجام آزمایشات تکمیلی دیگری چون ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات، بالا بردن حجم و پراکندگی بیشتر نمونه نیز توصیه می‌شود.
- منابع
1. Abdul K.U., Houweling M., Svensson F., Narayan R.S., Cornelissen F.M., Küçükosmanoglu A., Metzakopian E., Watts C., Bailey D., Wurdinger T., Westerman B.A. 2018. WINDOW consortium: a path towards increased therapy efficacy against glioblastoma. *Drug Resistance Updates*, 40:17-24.
 2. Arcuri C., Fioretti B., Bianchi R., Mecca C. Tubaro C., Beccari T., Franciolini F., Giambanco I., Donato R. 2017. Microglia-glioma cross-talk: a two-way approach to new strategies against glioma. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 22(2):268-309.
 3. Banu Z. 2019. Glioblastoma multiforme: a Review of its Pathogenesis and Treatment. *Int. Res. J. Pharm*, 9:7-12.
 4. Chen X., Fan X., Zhao C., Zhao Z., Hu L., Wang D., Wang R., Fang Z. 2020. Molecular subtyping of glioblastoma based on immune-related genes for prognosis. *Scientific Reports*, 10(1):1-12.
 5. Cui H.X., Zhang M.Y., Liu K., Liu J.,

- therapies to improve prognosis. *Brain*, 140(6):1548-1560.
20. Sarkaria J.N., Hu L.S., Parney I.F., Pafundi D.H., Brinkmann D.H., Laack N.N., Giannini C., Burns T.C., Kizilbash S.H., Laramy J.K., Swanson K.R. 2018. Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*, 20(2):184-191.
21. Shuai Y., Ma Z., Lu J., Feng J. 2020. LncRNA SNHG15: a new budding star in human cancers. *Cell Proliferation*, 53(1): 12716.
22. Sun X., Bai Y., Yang C., Hu S., Hou Z., Wang G. 2019. Retracted Article: Long noncoding RNA SNHG15 enhances the development of colorectal carcinoma via functioning as a ceRNA through miR-141/SIRT1/Wnt/ β -catenin axis. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1):2536-2544.
23. Wang C.J., Zhu C.C., Xu J., Wang M., Zhao W.Y., Liu Q., Zhao G., Zhang Z.Z. 2019. The lncRNA UCA1 promotes proliferation, migration, immune escape and inhibits apoptosis in gastric cancer by sponging anti-tumor miRNAs. *Molecular Cancer*, 18(1):1-12.
24. Wu D.M., Wang S., Wen X., Han X.R., Wang Y.J., Shen M., Fan S.H., Zhang Z.F., Shan Q., Li M.Q., Hu B. 2018. LncRNA SNHG15 acts as a ceRNA to regulate YAP1-Hippo signaling pathway by sponging miR-200a-3p in papillary thyroid carcinoma. *Cell Death and Disease*, 9(10):1-15.
25. Zhang J.H., Wei H.W., Yang H.G. 2016. Long noncoding RNA SNHG15, a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *European Review in Medicine and Pharmacological Sciences*, 20(9):1720-1724.
- Glioblastoma to Recognize Potential Biomarker Candidates. *Frontiers in Genetics*, 13:832742.
13. Li Z., Zhang J., Zheng H., Li C., Xiong J., Wang W., Bao H., Jin H., Liang P. 2019. Modulating lncRNA SNHG15/CDK6/miR-627 circuit by palbociclib, overcomes temozolomide resistance and reduces M2-polarization of glioma associated microglia in glioblastoma multiforme. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1):1-13.
14. Liu Y., Li J., Li F., Li M., Shao Y., Wu L. 2019. SNHG15 functions as a tumor suppressor in thyroid cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4):6120-6126.
15. Ma Y., Xue Y., Liu X., Qu C., Cai H., Wang P., Li Z., Li Z., Liu Y. 2017. SNHG15 affects the growth of glioma microvascular endothelial cells by negatively regulating miR-153. *Oncology Reports*, 38(5):3265-3277.
16. Mamelak A.N., Jacoby D.B. 2007. Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4(2):175-186.
17. Müller Bark J., Kulasinghe A., Chua B., Day B.W., Punyadeera C. 2020. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 122(3):295-305.
18. Pi J., Liu J., Zhuang T., Zhang L., Sun H., Chen X., Zhao Q., Kuang Y., Peng S., Zhou X., Yu Z. 2018. Elevated expression of miR302-367 in endothelial cells inhibits developmental angiogenesis via CDC42/CCND1 mediated signaling pathways. *Theranostics*, 8(6):1511.
19. Poon C.C., Sarkar S., Yong V.W., Kelly J.J. 2017. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for

Evaluation of LncRNA SNHG15 Expression Changes in the Tissues of Glioblastoma Multiforme Patients Using Real-Time PCR

Sahar Shakeri Yekta¹, Elham Moslemi^{2*}, Soyar Sari¹, Fatemeh Roholla¹,
Hamidreza Kheiri³

1. Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

Abstract

Glioblastoma is an aggressive malignant tumor of the brain and spinal cord. Several lines of evidence indicate an important oncogenic role of highly non-coding RNA (lncRNA) molecules in a variety of cancers including glioma, however, the tumorigenic function of lncRNA in glioma remains largely unclear. Increasing evidence has shown that lncRNAs, including LncRNA SNHG15, play an important role in the pathophysiology of human diseases, especially in the pathogenesis and progression of cancers. In this study, 25 paraffin tissue blocks of patients with glioblastoma multiforme and tumor margin tissue were collected and RNA extracted. Synthesis of cDNA and analysis of SNHG15 expression was done by Real-Time PCR technique. ROC curve was drawn to check the biomarker value and statistical analysis was done by GraphPad Prism v.8.0.1. An increase in the expression of SNHG15 was recorded in the tissue samples of patients compared to the tissue of the tumor margin ($p < 0.0001$). There was a significant relationship in the expression of this gene in patients aged more than 50 years and less than 50 years ($p = 0.6573$), Frontal, Temporal, Parietal, Occipital, and Other locations (P value = 0.9802), survival in more than 12 months and less than 12 months ($p = 0.5007$) was not observed, only in male and female sex ($p = 0.0001$) was registered. The expression of LncRNA SNHG15 was recorded in the tumor tissue of patients with glioblastoma multiforme more than in the peripheral tumor tissue. By examining the ROC curve, it is possible that LncRNA SNHG15 can be proposed as a biomarker, but it needs more studies.

Keywords: SNHG15, Glioblastoma Multiforme, Real-Time PCR, LncRNA, Gene Expression.

