DOI: 10.48305/jims.v43.i836.1373

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و سوم/شماره‌ی ۸۳۶/هفته‌ی چهارم آذر ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۷ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۷ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۰۹/۲۹

بررسی نقش lncRNAهای مرتبط با سلول‌های T در عود گلیوبلاستوما با استفاده از تحلیل توالی‌یابی RNA تک سلولی

مرتضی هادی‌زاده[۱]، احمدرضا بشارت‌نیا[۲]، فائزه خدامرادی چالشتری[۳]، ثریا قاسمی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گلیوبلاستوما GBM (Glioblastoma)، یکی از تومورهای بدخیم اولیه سیستم عصبی مرکزی است. محدودیت‌های جراحی و مقاومت به درمان، از چالش‌های مهم درمان آن محسوب می‌شوند. گلیوبلاستوما، به دلیل ناهمگنی ژنتیکی، حضور سلول‌های بنیادی سرطانی CSC (Cancer stem cells) و ریزمحیط توموری منحصر به فرد TME (Tumor microenvironment) نرخ عود بالایی دارد. تغییرات ژنومی و بیان ژنی که در تومور عودیافته رخ می‌دهد، با تومور اولیه متفاوت است. هدف این مطالعه، شناسایی lncRNAهای مرتبط با سلول‌های دخیل در عود و بررسی نقش آن‌ها در تنظیم پاسخ ایمنی و مکانیسم‌های مربوطه با استفاده از تحلیل بیوانفورماتیکی داده‌های RNA تک سلولی بود.

روش‌ها: در این مطالعه با آنالیز اطلاعات توالی‌یابی RNA تک سلولی scRNA (cell RNA sequencing seq) single)، تفاوت‌های بیان lncRNAها در گونه‌های مختلف سلولی (Cell Type) گلیوبلاستومای اولیه و عودیافته بررسی شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از پکیج SingleR انجام گردید. سلول‌های متفاوت، بر اساس الگوی بیان ژنی به چهار نوع مختلف دسته‌بندی شدند که سلول‌های T به دلیل نقش کلیدی‌شان در ریزمحیط توموری و ایمنی جهت مطالعه انتخاب شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که یازده lncRNA از جمله LINC01088، PVT1 و KCNQ1OT1 در سلول‌های T بین گلیوبلاستومای اولیه و عود یافته تفاوت بیان معنادار دارند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه بینش‌های جدیدی در زمینه‌ی تفاوت‌های بیان ژنی بین گلیوبلاستومای اولیه و عودیافته و نقش lncRNAها به عنوان اهداف درمانی بالقوه ارائه می‌دهد. همچنین احتمالاً این lncRNAها می‌توانند از طریق تنظیم بیان ژن‌های و مسیرهای مرتبط با سرطان، در شکل‌گیری و عود مجدد گلیوبلاستوما نقش داشته باشند. نتیجه‌گیری دقیق و نهایی نیازمند مطالعات تکمیلی است.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما؛ RNA؛ lncRNA؛ تک سلولی؛ لنفوسیت‌های T؛ ریزمحیط تومور (TME)

ارجاع: هادی‌زاده مرتضی، بشارت‌نیا احمدرضا، خدامرادی چالشتری فائزه، قاسمی ثریا. **بررسی نقش lncRNAهای مرتبط با سلول‌های T در عود گلیوبلاستوما با استفاده از تحلیل توالی‌یابی RNA تک سلولی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۳۶): ۱۳۷۳– ۱۳۸۲.

مقدمه

گلیوبلاستوما (Glioblastoma) GBM، شایع‌ترین و تهاجمی‌ترین تومور مغزی است (۱). سالانه حدود ۱۷،۰۰۰ مورد جدید مبتلا به آن شناسایی می شود (۲). پیش‌آگهی این تومور به دلیل مقاومت به درمان و میزان بالای عود مجدد، بسیار پایین است (۳)، به‌طوری که میزان بقای پنج‌ساله بیماران حدود ۷/۲ درصد است (۴). از بزرگترین چالش‌ها در درمان گلیوبلاستوما، هتروژنی بالای تومور و عود تقریباً همه‌گیر پس از درمان است (۵). تومورهای عود کرده به دلیل مقاومت دارویی و تفاوت‌های قابل توجه در هتروژنی نسبت به تومور اولیه، درمانی به مراتب دشوارتر دارند (۶).

در تومورهای جامد، سلول‌ها بر اساس پروفایل بیان ژنی به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می شوند. این تنوع به دلیل تغییرات ژنی، حضور

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲– مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳– مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ثریا قاسمی: مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: sorayya.ghasemi@gmail.com

سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer stem cells) CSC و تأثیرات ریزمحیط توموری (Tumor microenvironment) TME ایجاد می‌شود. ریزمحیط توموری شامل انواع سلول‌ها از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها و لنفوسیت‌های T می‌باشد. در گلیوبلاستوما نیز انواع مختلف سلوله مشاهده می شود (۷-۹). حضور سلول‌های مختلف، عملکرد و اثرات متفاوتی دارند؛ برای مثال سلول‌های T برای ایمنی تطبیقی بسیار مهم هستند و می‌توانند اثرات ضد توموری در گلیوما داشته باشند و سلول‌های T تنظیم‌کننده (Tregs) و سیتوکین‌های سرکوب‌کننده ایمنی مختلف که توسط سلول‌های گلیوما آزاد می‌شوند، اغلب ممکن است عملکرد آنها را سرکوب کرده و سبب ایجاد چالش‌های متعددی برای سلول‌های T در گلیوما شوند (۱۰).

امروزه، فناوری توالی‌یابی RNA تک سلولی (scRNA-seq) به عنوان یک ابزار مؤثر برای بررسی پروفایل‌های بیانی و تنوع سلولی در تومورهای جامد به کار می‌رود (۱۱). برای مثال، این روش امکان تحلیل تفکیک‌پذیر سلول به سلول را فراهم می‌کند و به شناسایی RNAهای غیرکدکننده (ncRNAs (Noncoding RNAs از جمله lncRNAها کمک می‌کند (۱۲). lncRNAها به‌عنوان RNAهای بلند غیرکدکننده، در فعالیت‌های اساسی سلولی مانند تنظیم بیان ژن و تغییرات اپی‌ژنتیکی نقش دارند (۱۳). با توجه به فعالیت‌های متنوع و پایداری بالای این نوع ncRNAها، آن‌ها می‌توانند در سرطان‌ها، از جمله گلیوبلاستوما، نقش‌های کلیدی مؤثر در پیشبرد تکثیر سلولی، مهار آپوپتوز، آنژیوژنز، سرکوب سیستم ایمنی، تهاجم و متاستاز ایفا کنند (۱۴).

با توجه به نرخ بالای عود مجدد گلیوبلاستوما و تغییرات پروفایل بیانی در تومورهای عود یافته، پیش‌بینی می‌شود، در آنالیز داده های scRNA-seq، جمعیت‌های سلولی مختلف و متنوع‌تری مشاهده شود. رویکردهای درمانی که بر مبنای پروفایل‌های بیانی یا جهش‌ها به‌طور هدفمند انتخاب شوند، می‌توانند اثربخشی بیشتری داشته باشند. پتانسیل lncRNAها به‌عنوان اهداف درمانی، زمینه‌ساز انجام مطالعات گسترده‌تری در این زمینه شده است. در این مطالعه، به بررسی تفاوت‌های انواع مختلف سلولی در نمونه‌های عود یافته‌ی گلیوبلاستوما پرداخته می‌شود و lncRNA های مختلف مرتبط و نقش آن‌ها معرفی میگردد. لذا به نظر می‌رسد، نتایج این پژوهش می‌تواند در درمان‌های نوین گلیوبلاستوما، همچون درمان هدفمند و پزشکی شخصی، مفید واقع شود.

روش‌ها

انتخاب داده‌ها و آماده‌سازی اولیه

داده‌های بیان ژن تک‌سلولی (scRNA-seq) با شماره دسترسی GSE138794 از پایگاه داده GEO دانلود شد. این مجموعه شامل نمونه‌های تومورى و عود یافته از بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما است. تمامی نمونه‌ها در دیتاست نام برده، مربوط به تومورهای گلیوما با مشخصه "Progression: Primary" هستند که نشان‌دهنده‌ی تومورهای اولیه می باشد؛ این نوع تومورها معمولاً به صورت گلیوبلاستومای اولیه (De Novo) تعریف می شوند که شایع‌ترین و تهاجمی‌ترین نوع گلیوبلاستوما است. کنترل کیفیت و پیش‌پردازش داده‌ها با استفاده از نسخه ۳ پکیج Seurat در زبان برنامه‌نویسی R انجام شد. سلول‌های نامناسب، شامل ژن‌های قابل تشخیص در ۳ سلول یا کمتر و سلول‌های با کیفیت پایین (کمتر از ۲۰۰ ژن قابل شناسایی)، از تحلیل حذف شدند. بیان ژن سلول‌های باقی‌مانده با استفاده از یک مدل رگرسیون خطی نرمال‌سازی شد.

داده‌های بیان ژن تک‌سلولی (scRNA-seq) با شماره دسترسی GSE138794 از پایگاه داده GEO دانلود شد. این مجموعه شامل نمونه‌های تومورى و عود یافته از بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما است. کنترل کیفیت و پیش‌پردازش داده‌ها با استفاده از نسخه ۳ پکیج Seurat در زبان برنامه‌نویسی R انجام شد. سلول‌های نامناسب، شامل ژن‌های قابل تشخیص در ۳ سلول یا کمتر و سلول‌های با کیفیت پایین (کمتر از ۲۰۰ ژن قابل شناسایی)، از تحلیل حذف شدند. نرمال سازی داده‌ها با استفاده از روش LogNormalize انجام شد.

شناسایی گونه‌های سلولی و تحلیل خوشه‌بندی

برای شناسایی و تحلیل دقیق سلول‌ها از روش FindIntegrationAnchors برای ادغام نمونه‌ها استفاده شد. تعداد ۲۰۰۰ ژن با واریانس بالا برتر با استفاده از تابع FindVariableFeatures انتخاب شدند. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر روی این ژن‌ها انجام شد تا داده‌ها به فرمت کم‌بعدی تبدیل شوند. ۲۰ مؤلفه اصلی با استفاده از نمودار ElbowPlot و وضوح ۰/۴ برای تحلیل خوشه‌بندی انتخاب شدند. برای تصویرسازی و خوشه‌بندی، روش RunUMAP بر روی این مؤلفه‌ها اعمال شد. خوشه‌های سلولی با استفاده از پکیج SingleR شناسایی و هر خوشه به یک گونه سلول اختصاص داده شد.

استخراج lncRNAهای تغییر بیان یافته معنی‌دار

با بهره‌گیری از تابع FindMarkers، ژن‌های معنی‌دار بین گونه‌های سلولی تومورى و عود یافته استخراج شدند. معیار انتخاب ژن‌ها شامل $|\log2FC| \geq 1$ و P.adjusted value $\leq$ ۰/۰۵ با استفاده از آزمون Wilcoxon بود. از میان ژن‌های معنی‌دار، lncRNAها جدا شدند و ارتباط آن‌ها با سرطان بررسی شد (۱۵، ۱۶).

بررسی ارتباط LncRNAها با سلول‌های ایمنی و سرطان

LncRNAهای مربوط به سلول‌های T جدا شدند و ارتباط آن‌ها با سایر سرطان‌ها و miRNAها مطالعه شد. همچنین، با استفاده از

مقالات موجود، نقش LncRNAها در تنظیم سلول‌های ایمنی مطالعه گردید. برای بررسی نقش LncRNAها در گلیوبلاستوما، ارتباط آن‌ها با ژن‌های مسیرهای سیگنالینگ مرتبط مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از پایگاه های داده های Lnc2Cancer، NONCODE و ENCORI و تحقیقات دیگر، ارتباط آن‌ها با مسیرهای کلیدی سرطان بررسی و مشاهده شده است (۱۷-۲۳).

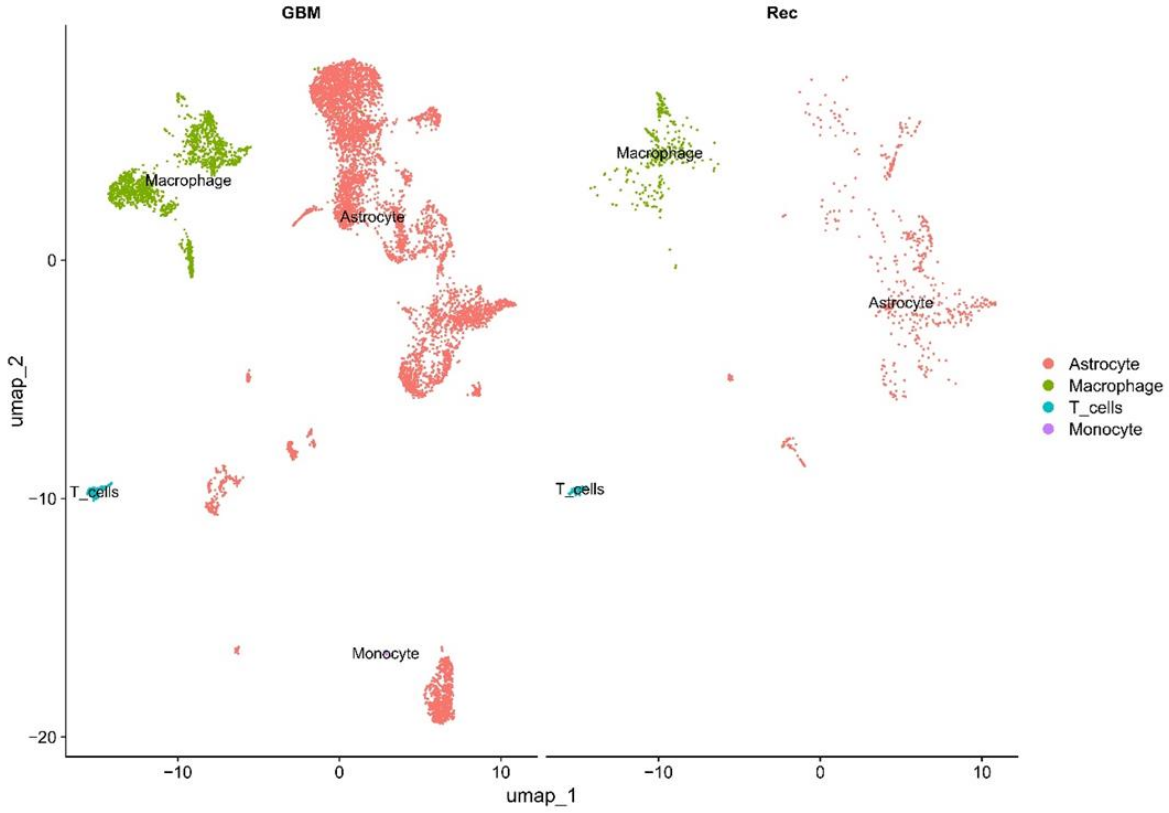
یافته‌ها

انتخاب داده‌ها و آماده‌سازی اولیه

داده‌های GSE138794 شامل آنالیز RNA تک‌سلولی از ۲۸ نمونه‌ی مختلف بود که در این مطالعه، به منظور افزایش دقت و تمرکز بر ویژگی‌های خاص، شش نمونه را از میان آن‌ها انتخاب شد. این شش نمونه شامل پنج نمونه از گلیوبلاستوماهای اولیه (Primary glioblastoma) و یک نمونه از تومور عودیافته (Recurrent glioblastoma) بود. انتخاب این نمونه‌ها بر اساس معیارهای مشخصی صورت گرفت تا بتوان تفاوت‌های بیانی بین مراحل اولیه و عود تومور را بررسی نمود. همچنین تمامی نمونه‌های انتخاب شده دارای ژن IDH1 با جهش R132H سالم (wild type) بودند که این امر اهمیت زیادی در تعیین نوع و ویژگی‌های مولکولی تومور دارد. زیرا جهش در این ژن معمولاً با زیرگروه‌های خاصی از گلیوبلاستوما مرتبط است و می‌تواند بر پاسخ به درمان و پیش‌آگهی بیماری تأثیرگذار باشد. نحوه‌ی انتخاب نمونه‌ها این امکان را می‌دهد که تحلیل‌های دقیق‌تری در زمینه‌ی بیان ژن های تک‌سلولی و تفاوت های مولکولی بین نمونه‌های اولیه و عود یافته انجام شود.

شناسایی گونه‌های سلولی و تحلیل خوشه‌بندی

حاشیه‌نویسی گونه‌های سلولی (Cell type annotation) در این مطالعه با استفاده از پکیج SingleR انجام شد که یک ابزار مرجع‌محور برای شناسایی نوع سلول‌ها در داده‌های RNA تک سلولی است. در نمونه‌های مربوط به کاندیشن گلیوبلاستوما، چهار گونه سلولی اصلی شامل آستروسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های T و مونوسیت‌ها شناسایی شدند که هر کدام با استفاده از الگوهای بیان ژنی مشخص و مرجع‌های داده‌ای معتبر تفکیک شدند. در نمونه‌های مربوط به حالت عود یافته، سه گونه سلولی شامل آستروسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های T شناسایی شدند که نشان‌دهنده‌ی تغییرات احتمالی در ترکیب سلولی محیط تومور پس از درمان یا پیشرفت بیماری است (شکل ۱).



شکل ۱. الگوریتم UMAP برای کاهش ابعاد ۲۰ مؤلفه اصلی (PC) مورد استفاده قرار گرفت و چهار خوشه سلولی را طبقه‌بندی و با پکیج SingleR حاشیه‌نویسی.

جدول ۱. تعداد DEGها در هر نوع سلول بر اساس ژن‌های دارای تغییر بیان و تعداد و نام lncRNAهای معنی‌دار در هر نوع سلول (نتایج مطالعه‌ی حاضر)

	نوع سلول	تعداد ژن‌های با افزایش بیان	تعداد ژن‌های با کاهش بیان	تعداد lncRNAهای تغییر بیان یافته	lncRNAs	سرطان
۱	Astrocyte	۱۴۳	۳۵۴	۱۲	LINC01445,BAALC-AS1,DLX6-AS1,MIR503HG,AC093642.3,LINC01094,DRAIC,PVT1, EGFR-AS1,LINC00520,LINC01088,AC114730.3	N/A
۲	Macrophage	۳۷۳	۹۸	۱۸	MIR503HG, EGFR-AS1,PVT1,LINC01023,MIAT,KMT2E-AS1,KCNQ1OT1,BAALC-AS1,KIFC1,LINC00520,THUMPD3-AS1,LINC01480,AC093642.3,MIR44352HG,LINC01551, LINC01301,SNHG12,SOX21-AS1	N/A
۳	T cell	۲۸۷	۲۳۳	۱۱	DLX6-AS1,LINC01088,KMT2E-AS1,LINC01480,PVT1,EGFR-AS1,FOXD3-AS1,AC114730.3,KCNQ1OT1,LINC00844,LINC01094	GBM., PC1 OEC2, GSC3, CC4, HC5,PaC6,GBC7,OS8, KC9,BlC10, NSCLC11,LS12,CeC13,BC14,OC15,RClC16, NPC17,CAS18,TC19,NB20,RCC21,EC22,PHT23, ChC24

۱. سرطان پروستات، ۲. سرطان اپیتلیال تخمدان، ۳. سرطان معده، ۴. سرطان روده بزرگ، ۵. سرطان سلولی کبد، ۶. سرطان لوزالمعده، ۷. سرطان کیسه صفرا، ۸ استئوسارکوما، ۹. سرطان کلیه، ۱۰. سرطان مثانه، ۱۱. سرطان ریه غیر سلولی کوچک، ۱۲. لیومیوسارکوما، ۱۳. سرطان دهانه رحم، ۱۴. سرطان پستان، ۱۵. سرطان تخمدان، ۱۶. سرطان سلول‌های کلیوی شفاف، ۱۷. سرطان نازوفارنژال، ۱۸. آدنوکارسینوم روده بزرگ، ۱۹. سرطان تیروئید، ۲۰. نوروبلاستوما، ۲۱. سرطان سلول کلیوی، ۲۲. سرطان مری، ۲۳ .فشارخون ریوی، ۲۴. کولانژیوکارسینوما.

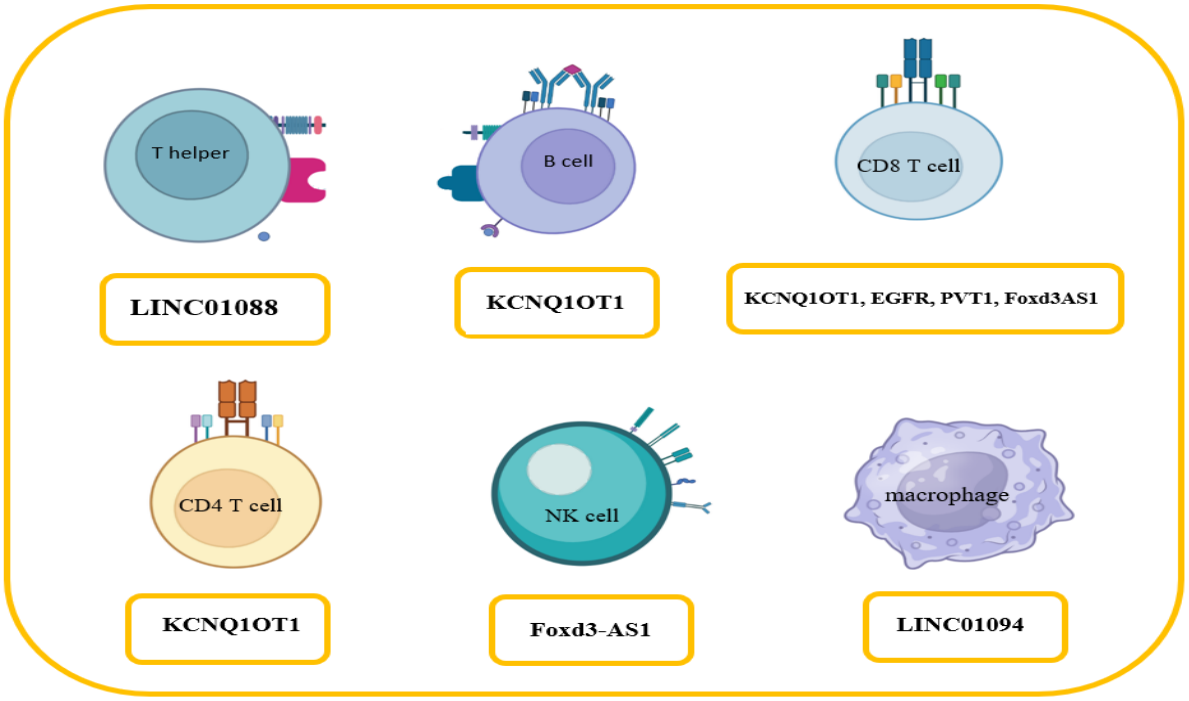
استخراج فهرست lncRNAهای تغییر بیان یافته معنی‌دار

در این مطالعه، با استفاده از تابع FindMarkers در پکیج Seurat، ژن های معنی‌دار از نظر بیان بین هر یک از گو نه های سلولی به صورت جفت‌جفت شناسایی شدند. این تابع که به طور گسترده در تحلیل داده‌های RNA تک‌سلولی به کار می‌رود، امکان مقایسه بیان ژن ها بین دو گروه سلولی را فراهم می‌کند و با استفاده از آزمون های آماری مناسب، ژن هایی را که به طور معناداری در یک گروه نسبت به گروه دیگر متفاوت بیان شده‌اند، استخراج می‌کند. نتایج حاصل از این آنالیز در فایل ضمیمه ۱ ارائه شده ا ست و شامل فهر ستی از ژن‌های تفکیکی هر گونه سلولی می باشد. از میان این ژن ها، lncRNAهای مرتبط که نقش های مهمی در تنظیم بیان ژن و عملکرد سلولی دارند، انتخاب و در جدول ۱ به صورت مجزا ارائه شده‌اند.

بررسی ارتباط LncRNAها با سلول‌های ایمنی و سرطان

در فایل ضمیمه ۲، ارتباط LncRNAها با سایر سرطان ها و miRNAها و همچنین ارتباط آن‌ها با سلول‌های بیان شده است. این ارتباطات در شکل ۲ نیز به اختصار نشان داده شده است. از طرفی، در جدول ۲، با بررسی ژن‌های مسیر سیگنالینگ گلیوبلاستوما، نقش هریک از آنها در این سرطان نشان داده شد. از آنجا که، lncRNAها می‌توانند نقش کلیدی در مسیرهای مختلف تکثیر، تمایز، تقسیم و مهاجرت سلول‌های سرطانی داشته‌باشند، بنابراین نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی بالقوه در سرطان بنظر می‌رسند. همچنین نقش هر یک از این LncRNAها در فرایندهای سلولی مرتبط با سرطان و ژن‌های درگیر در این فرایندها نیز بررسی شد.

تمرکز بر تحلیل‌های بیوانفورماتیکی انجام شده منجر به شناسایی گروهی از lncRNAها گردید که در تنظیم عملکرد ایمنی سلول‌های T نقش ایفا می‌کنند. یافته‌ها نشان دادند که بیان این lncRNAها در نمونه‌های عود یافته تغییر یافته و با مسیرهای سیگنالینگ ایمنی مرتبط هستند که می‌توانند به عنوان اهداف بالقوه برای پیش‌بینی عود یا درمان‌های ایمنی محور مطرح شوند.



شکل ۲. ارتباط Tcell و LncRNAها و سلول‌های ایمنی: هر کدام از این LncRNAهای یافت شده در این تحقیق، با دسته‌ای از سلول‌های ایمنی ارتباط دارند.

جدول ۲. ارتباط LncRNAها و گلیوبلاستوما و بررسی نقش آن‌ها در فرایندهای سلولی مرتبط با سایر سرطان‌ها http://ncpath.pianlab.cn .

گلیوبلاستوما		
lncRNA	ژن‌های هدف	نقش شناخته شده در سرطان
DLX6-AS1	CAM CAMK PKC ERK PI3k PKB/Akt CDK4/6 E2F	رشد و تکثیر سلول زنده‌مانی سلول پیشرفت G1\S
KMT2E-AS1	MDM2 CAM SOS PTEN MEK RB	رشد و تکثیر سلول پیشرفت G1\S
LINC01088	PKB	زنده‌مانی سلول
PVT1	PDGFR IGFR SHC PKC RAS RAF ERK PTEN P14ARF P14INK4a CDK4/6 RB	رشد و تکثیر سلول پیشرفت G1\S

جدول ۲. ارتباط LncRNAها و گلیوبلاستوما و بررسی نقش آن‌ها در فرایندهای سلولی مرتبط با سایر سرطان‌ها (ادامه)

سایر سرطان‌ها		
lncRNA	ژن‌های هدف	نقش شناخته شده در سرطان
DLX6-AS1	BCL2→TRAF	فرار از آپوپتوز
	MDM	نامیرایی
	E2f	تکثیر
LINC01088	SURVIVIN	فرار از آپوپتوز
	TGF-β	حفظ آپوپتوز
KMT2E-AS1	CIAPs	فرار از آپوپتوز تکثیر
	G-CSFR	مهار تمایز
LINC01480	PIG	آپوپتوز
PVT1	P14/ARF	نامیرایی
	C JUN	نکثیر سلولی
	C MYC	فرار از آپوپتوز
	HIF	حفظ رگ‌زایی
	SMAD2/3	عدم حساسیت به سیگنال ضد رشد
KCNQ10T1	TGF-β HER2 COX2	حفظ رگ‌زایی
	TCF/LEF	فرار از آپوپتوز
	MSK1 PDARY RB→E2F	تکثیر سلولی
	E2F	مهار تمایز
	MDM	نامیرایی
	MTF	مقاومت به شیمی‌درمانی
	GADD45	ناپایداری ژنومی
	HMSH2	ناپایداری ژنومی
LINC01094	PTEN	تکثیر سلولی
	PTEN	رگ‌زایی
	PTEN	ترمیم DNA
	SRCIN1 / SIRT1 / PARP1	تکثیر سلولی
FOXD3-AS1	MED28	آپوپتوز
	MAD3K2	تهاجم

CAM: Calmodulin ،CAMK: Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase ،PKC: Protein Kinase C ،ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase ،PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase ،PKB/Akt: Protein Kinase B / AKT ،CDK4/6: Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 ،E2F: E2F Transcription Factor ،MDM2: Mouse Double Minute 2 homolog ،KMT2E-AS1: KMT2E antisense RNA 1 ،SOS: Son of Sevenless homolog ، PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog ،MEK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase ،RB: Retinoblastoma Protein ،PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor ،PVT1: Plasmacytoma Variant Translocation 1 ،IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor ،SHC: SHC Adaptor Protein ،RAS: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog ،RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinase ،P14ARF: Alternate Reading Frame of CDKN2A ،P14INK4a: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A ،BCL2: B-Cell Lymphoma 2 ،TRAF: TNF Receptor Associated Factor ،SURVIVIN: Baculoviral IAP Repeat Containing 5 ،TGF-β: Transforming Growth Factor Beta ،CIAPs: Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins ،G-CSFR: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor ،PIG: p53-Induced Gene ،C JUN: Jun Proto-Oncogene ،C MYC: Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog ،HIF: Hypoxia-Inducible Factor ،SMAD2/3: SMAD Family Member 2 and 3 ،HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 ،COX2: Cyclooxygenase 2 ،KCNQ1OT1: KCNQ1 Opposite Strand/Antisense Transcript 1 ،TCF/LEF: T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor ،MSK1: Mitogen- and Stress-Activated Kinase 1 ،MTF: Metal Transcription Factor ،GADD45: Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein 45 ،MSH2: MutS Homolog 2 ،SRCIN1: SRC Kinase Signaling Inhibitor 1 ،SIRT1: Sirtuin 1 ،PARP1: Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 ،FOXD3-AS1: FOXD3 Antisense RNA 1 ،MED28: Mediator Complex Subunit 28 ،MAP3K2: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2 ،DLX6-AS1: DLX6 Antisense RNA 1 ،LINC01088: Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1088 ،LINC01480: Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1480 و ، LINC01094: Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1094.

بحث

در این مطالعه، با آنالیز داده‌های scRNA-seq در نمونه‌های گلیوبلاستومای اولیه و عود یافته، به بررسی و مقایسه‌ی گونه‌های مختلف سلول‌ها در این سرطان پرداخته شد. چهار گونه سلولی مختلف از جمله آستروسیت، ماکروفاژ، سلول T و مونوسیت شناسایی شدند. این سلول‌ها، بین گلیوبلاستومای اولیه و عود یافته پروفایل بیانی متفاوتی داشتند. سلول‌های T، آستروسیت‌ها وماکروفاژ که در هر دو گلیوبلاستومای اولیه و عود یافته تغییر بیان داشتند و گزینه‌هایی مناسب برای بررسی بیشتر بنظر می‌رسند. بررسی سلول‌های T با توجه به نقش مهمی که در ریز محیط توموری دارند، مورد بررسی قرار گرفت. بررسی این سلول‌ها نشان داد که در گلیوبلاستومای عود یافته نسبت به گلیوبلاستومای اولیه در سلول‌های T، ۲۸۷ ژن افزایش بیان و ۲۳۳ ژن کاهش بیان داشته‌اند. به علاوه، یازده lncRNA در نوع سلولی T بین تومور اولیه و ثانویه، تغییرات بیان معنی‌دار داشتند که نشان‌دهنده‌ی نقش احتمالی آن‌ها در مسیرهای پیام‌رسانی و در ایجاد یا حفظ سرطان‌ها از طریق تأثیر بر miRNAها است.

تحلیل داده‌های تک‌سلولی RNA-seq (scRNA-seq) در این مطالعه نشان داد، تومورهای اولیه و عودکننده دارای ترکیب‌های سلولی متفاوتی هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به دلایل متفاوتی باشند. تغییرات در پروفایل بیانی ژن‌ها، در تومورهای عودکننده، تغییرات گسترده‌ای در بیان ژن‌ها و lncRNAها مشاهده می‌شود که می‌تواند منجر به تفاوت‌های سلولی شود. از طرفی، حضور سلول‌های بنیادی سرطانی که قادرند به انواع مختلف سلول‌ها تمایز یابند. برای مثال، مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی سرطانی می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز یابند و در فرایند آنژیوژنز نقش داشته باشند. این فرایند می‌تواند منجر به مقاومت تومور به درمان‌های ضد آنژیوژنز شود (۲۴). همچنین، ریز محیط تومور، شامل سلول‌های ایمنی و سایر عوامل است که می‌تواند بر ترکیب سلولی تومور تأثیر بگذارد. برای مثال، حضور سلول‌های ایمنی در تومورهای عودکننده ممکن است به دلیل تغییرات در ریزمحیط تومور باشد. بطور کلی، این تفاوت‌ها می‌توانند بر پاسخ تومور به درمان تأثیر بگذارند و نیاز به رویکردهای درمانی جدید را نشان دهند.

در مطالعه‌ی حاضر تمرکز ما بر lncRNA های مرتبط با سلول‌های T بر اساس خوشه‌بندی بیان ژن در داده‌های تک‌سلولی بوده است. با این حال، زیرگروه‌بندی سلول‌های T مانند Th1، Treg و CTL در سطح بالای دقت نیازمند حضور مارکرهای اختصاصی و نیز تفکیک دقیق‌تر در آنالیز خوشه‌بندی می‌باشد. در داده‌های موجود، اگرچه سلول‌های T شناسایی شده‌اند، اما تفکیک دقیق آن‌ها به زیرمجموعه‌های تخصصی با اطمینان بالا ممکن نبود.

تقریباً ۳۰ درصد از حجم سلولی یک تومور گلیوبلاستوما را سلول‌های ایمنی تشکیل می‌دهند که این سلول‌های ایمنی در بافت تومور نفوذ پیدا می‌کنند (۲۵). حضور سلولی T را می‌توان به ریزمحیط تومور و البته عملکرد ضعیف سد خونی- مغزی نسبت داد. هرچند حضور سلول‌های T در ریزمحیط توموری گلیوبلاستوما به‌صورت کیفی و کمی غیرطبیعی است و ممکن است بیشتر به نقش آن‌ها در ریزمحیط تومور و نه عملکرد مستقیم ایمنی مرتبط باشد (۲۶). نقش دوگانه‌ی سلول‌های T، شامل هم تقویت و هم سرکوب ایمنی، پیچیدگی بیشتری به نتایج اضافه می‌کند. علاوه بر این، اگرچه تغییرات بیان ژنی در سلول‌های T بین گلیوبلاستومای اولیه و عود یافته بررسی شده است، اثر این تغییرات بر عملکرد سلولی و ایمنی تومور به‌صورت عملی مطالعه نشده و نیازمند تحقیقات تجربی بیشتری است.

مطالعات نشان می‌دهد، LncRNAها می‌توانند فعالیت ضد توموری داشته و به فرار تومور از سیستم ایمنی کمک کنند (۲۷، ۲۸). در این مطالعه ۱۱ lncRNA که در سلول‌های T در تومورهای اولیه و عود یافته تغییر بیان داشتند، شناسایی شدند. برخی از این lncRNAها مانند LINC01088، PVT1 و KCNQ1OT1، تأثیر زیادی بر تکثیر، تهاجم، گلیکولیز هوازی و مقاومت به درمان در سلول‌های گلیوبلاستوما دارند و می‌توانند اطلاعات مهمی در مورد مقاومت دارویی و عود تومور فراهم کرده و مسیرهای درمانی جدیدی مانند ایمنوتراپی و ژن درمانی را معرفی کنند. انواع دیگر مانند LINC01094 در آنژیوژنز و ناپایداری ژنی گزارش شده‌اند (۲۹، ۳۰).

در سال‌های اخیر، lncRNAها با تنظیم مسیرهای مختلفی همچون کنترل آپوپتوز، حفظ ویژگی های سلول های بنیادی توموری، القای EMT و تنظیم اتوفاژی، نقش پیچیده و کلیدی در توسعه مقاومت شیمی‌درمانی در گلیوما ایفا کرده و به‌عنوان اهداف مهم درمان‌های هدفمند مطرح شده‌اند. برای مثال، lncRNAهای متعددی با تنظیم بیان ژن ها و مسیر های مختلف مانند MGMT، c-Met، XRCC4 و ALDH1A1، در شیمی‌درمانی مهم هستند و در بهبود درمان‌های ترکیبی به عنوان اهداف درمانی جدید معرفی شده‌اند (۳۱، ۳۲).

مثالی دیگر، KMT2E-AS1 است که به دلیل حضور در ریزمحیط تومور احتمالا بتواند به عنوان نشانگری برای گلیوبلاستوما معرفی گردد (۳۳).

یکی از محدودیت‌های اصلی این مطالعه، تعداد کم نمونه‌ها (۶ نمونه از ۲۸ نمونه موجود) و تمرکز بر نمونه‌های IDH1-WT است که می‌تواند به شدت تعمیم‌پذیری نتایج را محدود کند. همچنین، تنها چهار گونه سلولی در نمونه‌های اولیه و سه گونه در نمونه‌های عودیافته شناسایی شده‌اند که ممکن است ناشی از محدودیت‌های کیفیت داده یا روش های پیش‌پردازش باشد. وجود گونه های

غیرمعمول مانند سلول‌های شبه هپاتوسیت نیز ممکن است به خطاهای تکنیکی یا تغییرات غیرطبیعی در پروفایل بیان ژنی اشاره داشته باشد. از سوی دیگر، پیچیدگی و حجم بالای داده های scRNA-seq چالش‌های آن، ممکن است به از دست رفتن برخی اطلاعات حین مراحل پیش‌پردازش گردد.

برای بهبود دقت و تعمیم‌پذیری نتایج، پیشنهاد می‌شود که تعداد نمونه‌ها افزایش یابد و تنوع آن‌ها شامل نمونه‌هایی با جهش IDH در نظر گرفته شود. ترکیب تکنیک‌های مکمل مانند spatial transcriptomics می‌تواند درک دقیق‌تری از موقعیت مکانی سلول‌ها در ریزمحیط تومور فراهم کند. همچنین، انجام آزمایش‌های تجربی برای تأیید عملکرد lncRNAها در سلول‌های T ضروری است تا نقش آن‌ها به‌صورت عملکردی بررسی شود. مطالعه سایر گونه‌های سلولی با تغییرات اختصاصی در یک خوشه ژنی، مانند سلول‌های کشنده طبیعی و سلول‌های B، نیز می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های عود تومور کمک کند. نتیجه‌گیری حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی گامی مهمی شناسایی مکانیسم‌های مولکولی در سرطان‌ها است.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر با بهره‌گیری از داده‌های RNA تک‌سلولی، به شناسایی lncRNAهای خاصی پرداخت که در سلول‌های T موجود در ریزمحیط تومور گلیوبلاستوما نقش دارند و ممکن است با عود تومور مرتبط باشند. یافته‌ها نشان می‌دهند که برخی از lncRNAها در سلول‌های T ایمنی نقش‌های کلیدی در تنظیم عملکرد ایمنی و تعامل با سلول‌های توموری ایفا می‌کنند و در نمونه‌های بازگشتی بیان متفاوتی دارند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای پیش‌بینی بازگشت بیماری یا به عنوان اهداف درمانی جدید مدنظر قرار گیرند. در مجموع، شناسایی lncRNAهای خاص سلول‌های Tدر گلیوبلا ستومای عودکننده، گامی مؤثر در جهت درک عمیق‌تر از سازوکارهای بازگشت تومور و طراحی استراتژی‌های درمانی هدفمند مبتنی بر ریزمحیط تومور است. ادامه تحقیقات عملکردی بر روی این lncRNAها می‌تواند چشم‌اندازهای نوینی را برای مداخلات درمانی در بیماران مبتلا به GBM فراهم آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی با کد ۷۶۰۲ می‌باشد که در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به تصویب رسیده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به انجام رسیده است..

References

1. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. JAMA 2013; 310(17): 1842-50.
2. Khasraw M, Fujita Y, Lee-Chang C, Balyasnikova IV, Najem H, Heimberger AB. New approaches to glioblastoma. Annu Rev Med 2022; 73(1): 279-92.
3. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. Neuro Oncol 2020; 22(Suppl 1): iv1-iv96.
4. Birzu C, French P, Caccese M, Cerretti G, Idbaih A, Zagonel V, et al. Recurrent glioblastoma: from molecular landscape to new treatment perspectives. Cancers (Basel)2020; 13(1): 47.
5. Perdyan A, Lawrynowicz U, Horbacz M, Kaminska B, Mieczkowski J. Integration of single-cell RNA sequencing and spatial transcriptomics to reveal the glioblastoma heterogeneity. F1000Res 2023; 11: 1180.
6. Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. Science 2014; 343(6167): 189-93.
7. Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics. Genome Res 2015; 25(10): 1491-8.
8. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. Cancer Cell 2012; 21(3): 283-96.
9. Arneth B. Tumor microenvironment. Medicina (Kaunas) 2019; 56(1): 15.
10. Noor L, Upadhyay A, Joshi V. Role of T Lymphocytes in Glioma Immune Microenvironment: Two Sides of a Coin. Biology (Basel) 2024; 13(10): 846.
11. Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. Mol Syst Biol 2019; 15(6): e8746.
12. Olsen TK, Baryawno N. Introduction to single-cell RNA sequencing. Curr Protoc Mol Biol 2018; 122(1): e57.
13. Stackhouse CT, Gillespie GY, Willey CD. Exploring the roles of lncRNAs in GBM pathophysiology and their therapeutic potential. Cells 2020; 9(11): 2369.
14. Li Q, Jia H, Li H, Dong C, Wang Y, Zou Z. LncRNA and mRNA expression profiles of glioblastoma multiforme (GBM) reveal the potential roles of lncRNAs in GBM pathogenesis. Tumour Biol 2016; 37(11): 14537-52.
15. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, et al. Comprehensive integration of single-cell data. Cell 2019; 177(7): 1888-902. e21.
16. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, et al. Reference-based analysis of lung single-cell

sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. Nat Immunol 2019; 20(2): 163-72.
17. Tian S, Liu J, Kong S, Peng L. LncRNA DLX6-AS1 as a potential molecular biomarker in the clinicopathology and prognosis of various cancers: a meta-analysis. Biosci Rep 2020; 40(8): BSR20193532.
18. Lingadahalli S, Jadhao S, Sung YY, Chen M, Hu L, Chen X, et al. Novel lncRNA LINC00844 regulates prostate cancer cell migration and invasion through AR signaling. Mol Cancer Res 2018; 16(12): 1865-78.
19. Guan Y, Bhandari A, Xia E, Yang F, Xiang J, Wang O. lncRNA FOXD3-AS1 is associated with clinical progression and regulates cell migration and invasion in breast cancer. Cell Biochem Funct 2019; 37(4): 239-44.
20. Kikuchi Y, Tokita S, Hirama T, Kochin V, Nakatsugawa M, Shinkawa T, et al. CD8+ T–cell immune surveillance against a tumor antigen encoded by the oncogenic long noncoding RNA PVT1. Cancer Immunol Res 2021; 9(11): 1342-53.
21. Hu J, Qian Y, Peng L, Ma L, Qiu T, Liu Y, et al. Long noncoding RNA EGFR-AS1 promotes cell proliferation by increasing EGFR mRNA stability in gastric cancer. Cell Physiol Biochem 2018; 49(1): 322-34.
22. Zhu D, Ouyang X, Zhang Y, Yu X, Su K, Li L. A promising new cancer marker: Long noncoding RNA EGFR-AS1. Front Oncol 2023; 13: 1130472.
23. Zhu B, Liu W, Liu H, Xu Q, Xu W. LINC01094 down-regulates miR-330-3p and enhances the expression of MSI1 to promote the progression of glioma. Cancer Manag Res 2020: 6511-21.
24. Xie Y, He L, Lugano R, Zhang Y, Cao H, He Q, et al. Key molecular alterations in endothelial cells in human glioblastoma uncovered through single-cell RNA sequencing. JCI insight 2021; 6(15): e150861.
25. Yeo AT, Rawal S, Delcuze B, Christofides A, Atayde A, Strauss L, et al. Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression. Nat Immunol 2022; 23(6): 971-84.
26. Jindal V. Role of chimeric antigen receptor T cell therapy in glioblastoma multiforme. Mol Neurobiol 2018; 55(11): 8236-42.
27. Yu W, Ma Y, Hou W, Wang F, Cheng W, Qiu F, et al. Identification of immune-related lncRNA prognostic signature and molecular subtypes for glioblastoma. Front Immunol 2021; 12: 706936.
28. Wang X, Gao M, Ye J, Jiang Q, Yang Q, Zhang C, et al. An immune gene-related five-lncRNA signature for to predict glioma prognosis. Front Genet 2020; 11: 612037.
29. Sheykhhasan M, Ahmadyousefi Y, Seyedebrahimi R, Tanzadehpanah H, Manoochehri H, Dama P, et al. DLX6-AS1: a putative lncRNA candidate in multiple human cancers. Expert Rev Mol Med 2021; 23: e17.
30. NcPath database. Available from: http://ncpath.pianlab.cn/.
31. Zeng Z, Chen Y, Geng X, Zhang Y, Wen X, Yan Q, et al. NcRNAs: Multi-angle participation in the regulation of glioma chemotherapy resistance. Int J Oncol 2022; 60(6): 76.
32. Chae Y, Roh J, Kim W. The roles played by long non-coding RNAs in glioma resistance. Int J Mol Sci 2021; 22(13): 6834.
33. Peng T, Chen D-L, Chen S-L. LINC01088 promotes the growth and invasion of glioma cells through regulating small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A transcription. Bioengineered 2022; 13(4): 9172-83.

DOI: *10.48305/jims.v43.i836.1373*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 43, No. 836, 4th Week, December 2025**

Received: 05.02.2025 Accepted: 08.12.2025 Published: 20.12.2025

Investigating the Role of T-cell-associated Lncrnas in Glioblastoma Recurrence Using Single-cell RNA Sequencing Analysis

Morteza Hadizadeh[1], Ahmadreza Besharatnia[2], Faeze Khodamoradi Chaleshtori[3], Sorayya Ghasemi[4]

Original Article

Abstract

Background: Glioblastoma (GBM) is one of the primary malignant tumors of the central nervous system. Surgical limitations and resistance to therapy are important challenges in its treatment. This cancer has a high recurrence rate due to genetic heterogeneity, the presence of cancer stem cells (CSCs), and a unique tumor microenvironment (TME). The aim of this study is to identify lncRNAs associated with cells involved in recurrence and to investigate their role in regulating the immune response and related mechanisms using bioinformatic analysis of single-cell RNA data.

Methods: In this study, the differences in lncRNA expression among various cell types in primary and recurrent GBM were investigated using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis. Data analysis was performed using the SingleR package. Cells were classified into four distinct types based on gene expression patterns. Among these, T cells were selected for further study due to their key role in the tumor microenvironment and immune response.

Findings: The different cells were categorized into 4 distinct types based on their gene expression profiles. Among these types, T cells were selected due to their pivotal role in the tumor microenvironment and immunity. The results revealed that 11 lncRNAs, including LINC01088, PVT1, and KCNQ1OT1, exhibited different expression levels in T cells between primary and recurrent GBM.

Conclusion: This study provides new insights into the differences in gene expression between primary and recurrent GBM and highlights the potential of lncRNAs as therapeutic targets. It is likely that these lncRNAs play a role in glioblastoma formation and recurrence by regulating cancer-related gene expression and pathways. Definitive and final conclusions require further complementary studies.

Keywords: Glioblastoma; RNA; Long Noncoding; Single-cell; T-Lymphocytes; Tumor microenvironment (TME)

Citation: Hadizadeh M, Besharatnia A, Khodamoradi Chaleshtori F, Ghasemi S. **Investigating the Role of T-cell-associated Lncrnas in Glioblastoma Recurrence Using Single-cell RNA Sequencing Analysis.** J Isfahan Med Sch 2025; 43(836): 1373-82.

1- Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2- Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
3- Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
4- Cancer Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Sorayya Ghasemi, Cancer Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; Email: sorayya.ghasemi@gmail.com