

## Evaluation of the *TXNIP* gene expression in gastric adenocarcinoma and its relationship with overall survival of patients

Zahra Shahsavari Haghghi<sup>1</sup>, Arezoo Farhadi<sup>1</sup>, Sara Rafi Taheri<sup>1</sup>, Ebrahim Hazrati<sup>2</sup>, Reza Heidari<sup>3,5</sup>,  
Mohammad Foad Heidari<sup>4</sup>, Mohsen Rajaeinejad<sup>5</sup>, Fatemeh Khodabandehloo<sup>3</sup>, Javad Behroozi<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Life Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

<sup>2</sup>Department of Anesthesiology and Critical Care, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Genetics and Advanced Medical Technology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Health Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Research Center for Cancer Screening and Epidemiology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 27 Nov 2022

Accepted: 19 Feb 2023

ePublished: 01 May 2023

#### Keywords:

- Gastric cancer
- TXNIP
- Gene expression
- Overall survival of patients

### Abstract

**Background.** Gastric Cancer (GC) is a common gastrointestinal tumor, and its incidence is increasing. The pathogenesis of GC is very complex and remains unclear. Recent basic studies of GC have focused on gene expression dysregulation. Accumulating evidence has demonstrated that thioredoxin-interacting protein (*TXNIP*) is abnormally expressed in a variety of malignant tumors but it is obscure in GC. This study aimed to compare the expression of the *TXNIP* gene in cancerous and adjacent tissue of gastric cancer and evaluate its clinical significance in the prognosis and survival analysis of gastric cancer patients.

**Methods.** A total of 50 tumor tissues and marginal non-tumor control tissues were obtained from GC patients. Also, *TXNIP* gene expression levels were evaluated by real-time PCR. Meanwhile, bioinformatic approaches were used to evaluate *TXNIP* expression in two different cohorts of GC patients. A data mining study was also performed to determine the prognostic role of *TXNIP* expression in the overall survival of GC. Furthermore, a pan-cancer analysis of *TXNIP* expression was performed using TCGA data.

**Results.** The *TXNIP* gene was down-regulated in tumor samples with a fold change of 0.33, and the same results were repeated in bioinformatics analysis. Decreased expression of *TXNIP* was significantly associated with metastasis, poor differentiation, and drug abuse. Our results provided evidence that *TXNIP* gene expression level is positively correlated with the overall survival of GC patients. Pan-cancer analysis of TCGA data revealed down-regulated *TXNIP* in a variety of malignant tumors.

**Conclusion.** This study established low *TXNIP* expression as a prognostic biomarker in GC. It also revealed that the decrease in *TXNIP* expression likely favors metastatic GC.

**Practical Implications.** Evaluation of *TXNIP* expression is informative in the prognosis of GC patients.

**How to cite this article:** Shahsavari Haghghi Z, Farhadi A, Rafi Taheri S, Hazrati E, Heidari R, Heidari M F, Rajaeinejad M, Khodabandehloo F, Behroozi J. Evaluation of the *TXNIP* gene expression in gastric adenocarcinoma and its relationship with overall survival of patients. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2023;45(2):117-129. doi: 10.34172/mj.2023.019. Persian.

\*Corresponding author; Email: [jvdbehroozi@gmail.com](mailto:jvdbehroozi@gmail.com)

© 2023 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## Extended Abstract

### Background

Gastric Cancer (GC) is a common gastrointestinal tumor, and its incidence is increasing. The pathogenesis of GC is very complex and remains unclear. There are three major subtypes of gastric cancer including intestinal, diffuse, and indeterminate or mixed, according to the Lauren classification system, and four subtypes based on the WHO classification system. Recent basic studies of GC have focused on gene expression dysregulation. Accumulating evidence has demonstrated that thioredoxin-interacting protein (*TXNIP*) is abnormally expressed in a variety of malignant tumors, but it is obscure in GC. Many studies have investigated the correlation between pathohistological characteristics in gastric cancer and patient specifications, disease-specific criteria, and overall outcome. This study aimed to compare the expression of the *TXNIP* gene in cancerous and adjacent tissues of gastric cancer and evaluate its clinical significance in the prognosis and survival analysis of gastric cancer patients.

### Methods

A total of 50 tumor tissues and marginal non-tumor control tissues were obtained from GC patients. RNA was purified from normal and marginal samples using the RNX-Plus solution, according to the manufacturer's protocol. RNA samples were reversely transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) using the BioFACT cDNA Synthesis Kit. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA with random hexamer and oligo (dT) as reaction primers in a final volume of 20 µl following the manufacturer's protocol. Complementary DNA was then used for quantification (with the *GAPDH* gene as a control) by real-time PCR, which was performed using the BioFACT qPCR master mix and the StepOnePlus real-time PCR system. Meanwhile, bioinformatic approaches were used to evaluate *TXNIP* expression in two different cohorts of GC patients. Raw paired-end RNA-seq samples related to eighty primary gastric adenocarcinoma and their paired non-tumor control tissues were retrieved from the publicly

available Gene Expression Omnibus (GEO) database. We performed a co-expression analysis of all protein-coding and non-coding genes in the GEO RNA-seq data. We also manually mined The Cancer Genome Atlas (TCGA) database to obtain *TXNIP* gene expression levels in GC patients and control individuals. A data mining study was also performed to determine the prognostic role of *TXNIP* expression in the overall survival of GC. In this respect, gene expression data and the survival information of 592 GC patients were derived from the Kaplan-Meier database. This information corresponds to the GSE22377, GSE29272, GSE51105, GSE15459, and GSE14210 datasets. Furthermore, a pan-cancer analysis of *TXNIP* expression was performed using TCGA data. We retrieved expression data of bladder urothelial carcinoma, breast invasive carcinoma, colon adenocarcinoma, esophageal carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, kidney chromophobe, kidney renal clear cell carcinoma, kidney renal papillary cell carcinoma, liver hepatocellular carcinoma, lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, prostate adenocarcinoma, rectum adenocarcinoma, stomach adenocarcinoma, thyroid carcinoma, uterine corpus endometrial carcinoma and compared *TXNIP* expression between normal and tumor samples.

### Results

*TXNIP* mRNA expression was quantified by RT-PCR of tumor and non-tumor specimens from GC cases. The *TXNIP* gene is down-regulated in tumor samples with a fold change of 0.33, and the same results were repeated in bioinformatics analysis ( $P < 0.01$ ). Decreased expression of *TXNIP* was significantly associated with clinic pathological variables like metastasis, poor differentiation, and drug abuse ( $P < 0.05$ ). However, *TXNIP* expression did not correlate with age, gender, smoking, alcohol drinking, primary tumor size, and primary tumor location. We extracted the set of the top 4 genes with the highest (positively correlated) and the lowest (negatively correlated) co-expression correlation with *TXNIP*. *CBX7*, *TOR1AIP1*, *WLS*, and *RAB5B*

were the top 4 positively correlated genes, while, *GTSE1*, *YIF1B*, *CDC45* and *CDCA3* were the top 4 negatively correlated genes, respectively. When *TXNIP* gene expression was evaluated, we used Cox regression analysis to determine the prognostic role of *TXNIP* gene expression. Patients were divided into high-risk and low-risk groups using the best cut-off. Also, Kaplan-Meier curves were used to explore the overall survival of the two groups. Our results provide evidence that *TXNIP* gene expression level is positively correlated with the overall survival of GC patients. Among the 375 patients in the high-expression group, the median overall survival was 28.8 months, while it was 14.4 months ( $P < 0.001$ ) in the low-expression group. Pan-cancer analysis of TCGA data revealed down-regulated *TXNIP* in a variety of malignant tumors.

### Conclusion

This study established low *TXNIP* expression as a prognostic biomarker in GC. It also revealed that the decrease in *TXNIP* expression likely favors metastatic GC. Our results disclosed that the more *TXNIP* gene expression, the higher overall survival. Furthermore, we concluded that the *TXNIP* gene not only is down-regulated in GC but also, in several other cancers. Gene co-expression analysis is an attractive tool for the prediction of gene functions, interaction, and regulatory mechanisms and we revealed *CBX7* gene has the highest co-expression correlation. These findings showed the key role of the *TXNIP* gene in the development of gastric cancer, which raises the possibility of using it as a prognostic marker in the management of this cancer.

## ارزیابی بیان ژن TXNIP در آدنوکارسینوم معده و ارتباط آن با بقا کلی بیماران

زهره شهسوار حقیقی<sup>۱\*</sup>، آرزو فرهادی<sup>۱</sup>، سارا رفیع طاهری<sup>۱</sup>، ابراهیم حضرتی<sup>۲</sup>، رضا حیدری<sup>۳</sup>، محمد فواد حیدری<sup>۴</sup>، محسن رجائی تژاده<sup>۵</sup>، فاطمه خدابنده‌لو<sup>۳</sup>، جواد بهروزی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران  
<sup>۲</sup>گروه بیهوشی و مراقبت‌های ویژه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران  
<sup>۳</sup>گروه فناوری‌های نوین و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران  
<sup>۴</sup>گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران  
<sup>۵</sup>مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی و پایش سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

### چکیده

**زصینه.** سرطان معده یکی از تومورهای شایع دستگاه گوارش است که بروز آن هر سال افزایش می‌یابد. سبب‌شناسی این بیماری پیچیده بوده و هنوز به صورت مبهم باقی مانده است. اخیراً بیشتر مطالعات پایه‌ای روی عدم تنظیم بیان ژن‌ها در این سرطان متمرکز شده‌اند. شواهد روزافزون نشان می‌دهند بیان پروتئین تعامل‌کننده با تیرودوکسین (TXNIP) در بسیاری از تومورهای بدخیم از تنظیم خارج می‌گردد اما این موضوع در مورد سرطان معده نامشخص است. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن TXNIP در بافت و حاشیه تومور معده و تعیین ارزش بالینی آن در پیش‌آگهی و بقا بیماران مبتلا به سرطان معده است.

**روش کار.** تعداد ۵۰ نمونه بافت تومور به همراه بافت حاشیه تومور از بیماران مبتلا به سرطان معده جمع‌آوری و بیان ژن TXNIP به روش ریل تایم PCR بررسی شد. همچنین با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، بیان ژن TXNIP در دو گروه از بیماران مبتلا به سرطان معده آنالیز شد. برای بررسی نقش پیش‌آگهی بیان ژن TXNIP در بقا کلی بیماران از یک مطالعه داده‌کاوی استفاده گردید. در ادامه برای بررسی بیان TXNIP در بین سرطان‌های مختلف از آنالیز داده‌های پایگاه اطلس ژنوم سرطان استفاده شد.

**یافته‌ها.** بیان ژن TXNIP در نمونه‌های توموری به میزان ۰/۳۳ برابر نمونه‌های سالم کاهش نشان داد. همین یافته در بررسی‌های بیوانفورماتیکی تکرار شد. کاهش بیان ژن TXNIP با متاستاز، تمایز پایین تومور و مصرف مواد مخدر ارتباط معناداری داشت. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن TXNIP با بقا کلی بیماران مبتلا به سرطان معده همبستگی مثبت دارد. آنالیز اطلاعات اطلس ژنوم سرطان نشان داد بیان ژن TXNIP در چندین مورد از بدخیمی‌ها کاهش می‌یابد.

**نتیجه‌گیری.** مطالعه ما بیان کاهش یافته ژن TXNIP را به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی دهنده برای سرطان معده مطرح می‌کند. همچنین نشان می‌دهد کاهش بیان ژن TXNIP احتمالاً به نفع متاستاز در سرطان معده است. **پیامدهای عملی.** بررسی میزان بیان جهت اطلاع از پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده آگاهی‌بخش است.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۶  
پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰  
انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱

#### کلید واژه‌ها:

- سرطان معده
- TXNIP
- بیان ژن
- بقا کلی بیماران

### مقدمه

سیستم طبقه‌بندی لورن، سرطان معده در سه دسته روده‌ای (intestinal)، منتشر (diffuse) و حد واسط (indeterminate) یا ترکیبی (mixed) قرار می‌گیرد.<sup>۱</sup> نوع روده‌ای به این دلیل به این نام خوانده می‌شود که شباهت زیادی بین این نوع از آدنوکارسینوم معده با آدنوکارسینوم‌های برخاسته از نقاط مختلف روده وجود دارد و سلول‌ها چسبندگی خوبی به یکدیگر دارند. نوع منتشر، از سلول‌های پراکنده تشکیل شده و به دلیل از بین رفتن اتصالات

سرطان معده از نظر بافت‌شناسی بسیار ناهمگون است. بیش از ۵۰ درصد موارد این سرطان چند شکل بوده و تنوع بافت‌شناسی آن با افزایش نفوذ به دیواره بیشتر می‌شود.<sup>۱</sup> با توجه به تنوع مورفولوژیکی، سیستم‌های طبقه‌بندی مختلفی برای این سرطان گسترش یافته‌اند، که مهم‌ترین و فراگیرترین آنها سیستم لورن (Lauren) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) است.<sup>۲</sup> بیش از ۹۵ درصد سرطان‌های معده از نوع آدنوکارسینوم بوده و بر اساس

\* نویسنده مسؤول: ایمیل: jvdbehroozi@gmail.com

حق تألیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) CC BY 4.0 منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

ارتباط با بیان ژن *TXNIP* و پیشرفت تومور منتشر شده است. برخی مطالعات بیان بالای این ژن در سرطان غیر سلول کوچک ریه را با بقا کلی کوتاه‌تر بیماران مرتبط دانسته‌اند<sup>۱۶</sup> یا بیان پایین این ژن به رشد تهاجمی کارسینوم هیپاتوسلولار نسبت داده شده است.<sup>۱۷</sup> در حالی که کاهش یا عدم بیان این ژن در رده‌های سلولی مدل‌های موشی و بافت‌های سرطان‌های مختلف پیشنهاد دهنده نقش سرکوبگر توموری برای این ژن است.<sup>۱۸،۱۹</sup> هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن *TXNIP* در بافت و حاشیه تومور معده و تعیین ارزش بالینی آن در پیش آگهی و بقا بیماران مبتلا به سرطان معده است.

### روش کار

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.AJAUMS.REC.1400.278 و با استفاده از ۵۰ نمونه بافت توموری و بافت حاشیه توموری (۳ سانتی‌متر فاصله از حاشیه تومور) که از بانک تومور بیمارستان امام خمینی (ره) شهر تهران تهیه شده بود انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه از بیمارانی به دست آمده بودند که در انستیتو کانسر تحت عمل جراحی سرطان معده قرار گرفته و از آنها رضایت‌نامه آگاهانه گرفته شده بود. قبل از انجام مطالعه نمونه‌هایی که معیارهای مورد نظر را نداشتند از مطالعه حذف شدند. معیار ورود نمونه به مطالعه، آدنوکارسینوم‌های معده از نوع منتشر بودند که قبل از جراحی تحت شیمی درمانی قرار نگرفته باشند. نمونه‌ها با استفاده از تانک ازت به آزمایشگاه منتقل شده و تا انجام آزمایش‌ها در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA تام طبق پروتکل محلول استخراج RNA (RNX-plus) شرکت سینازن (ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. قبل از استخراج، نمونه‌های بافتی با استفاده از نیتروژن مایع و هاون به صورت پودر درآمد. RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و دستگاه نانو دراپ از جهت کیفی و کمی کنترل شد و تا مرحله سنتز cDNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. همچنین از کیت DNase شرکت تاکارا برای حذف مولکول‌های DNA استفاده شد. جهت ساخت cDNA از کیت شرکت بیوفکت (BioFACT، کره) استفاده شد. برای این کار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با مستر میکس، راندوم هگزامر و الیگو dT مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (جهت رونویسی معکوس) انکوبه شد. در نهایت مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد (جهت غیرفعال شدن آنزیم نسخه‌بردار معکوس توسط تیمار حرارتی) تیمار شد. محصول حاصل در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد

بین سلولی، نمای غددی ایجاد نمی‌شود. سرطان معده‌ای که نیمی از سلول‌ها از نظر بافت‌شناسی منتشر و نیم دیگر روده‌ای باشند، ترکیبی نامیده می‌شود.<sup>۴</sup> در مورد پاتوژنز این بیماری اطلاعات کامل و دقیقی در دسترس نیست، اما به نظر می‌رسد که در اثر ترکیبی از عوامل محیطی مثل عفونت هلیکوباکتر پیلوری و رژیم غذایی و تغییرات ژنتیکی به وجود آید. ۱۰ تا ۱۵ درصد از موارد سرطان معده تجمع خانوادگی نشان می‌دهند، اما فقط ۱ تا ۳ درصد موارد مربوط به سندرم‌های خانوادگی مستعدکننده به سرطان معده هستند.<sup>۵</sup> جهش‌های رده زایا در ژن *CDHI* و ژن‌های تعمیر ناسازگاری به ترتیب عامل اصلی موارد نوع منتشر و نوع روده‌ای سرطان معده ارثی هستند.<sup>۱</sup> ناپایداری ژنتیکی یکی دیگر از عوامل توسعه سرطان است که در تمام انواع بافت‌شناسی سرطان معده مشاهده می‌شود. ناپایداری ژنومی یکی از اولین مراحل ایجاد سرطان معده است. سه نوع مختلف ناپایداری شامل ناپایداری میکروستلاستی، ناپایداری کروموزومی و فنوتیپ متیلاتور جزیره‌ای CpG در سرطان معده مشاهده می‌گردد.<sup>۶</sup> تغییرات بیان ژن و تعداد کپی ژن‌ها نیز به عنوان عوامل دخیل در پاتوژنز یا گسترش سرطان معده دخیل هستند.<sup>۷</sup> بیان نابجای ژن‌های *EGFR* و *VEGF* و همچنین افزایش تعداد نسخه ژن‌های *HER2* و *MET* با پیش‌آگهی این سرطان در ارتباط بوده و کاربرد بالینی دارد.<sup>۸</sup> پروتئین تعامل‌کننده با تیرودوکسین (Thioredoxin-interacting protein, TXNIP) یک پروتئین متصل‌شونده به تیرودوکسین است که در فرآیندهای مختلف سلولی مانند مقابله با استرس اکسیداتیو، مهار تکثیر سلولی و القا آپوپتوز نقش دارد. این پروتئین به دلیل مشارکت در طیف وسیعی از عملکردها در بیماری‌های قلبی، بیماری‌های تحلیل عصبی، سرطان‌ها، دیابت و برخی بیماری‌های دیگر مورد توجه واقع شده است.<sup>۹</sup> ژن کدکننده این پروتئین در ناحیه q21-22 کروموزم شماره ۱ قرار گرفته و اندازه‌ای برابر با ۴۱۷۴ نوکلئوتید و ۸ اگزون دارد.<sup>۱۰</sup> بر اساس میان‌کنش *TXNIP* با تیرودوکسین و عملکرد آن به عنوان یک تنظیم‌کننده اکسیداسیون-احیا، به نظر می‌رسد این پروتئین در سیتوپلاسم مستقر می‌شود.<sup>۱۱</sup> مطالعات دیگری نشان می‌دهند که *TXNIP* می‌تواند به میتوکندری منتقل شده و در آنجا به تیرودوکسین میتوکندریایی متصل گردد که در نهایت منجر به شکست کاسپاز-۳ و القا آپوپتوز می‌شود.<sup>۱۲</sup> همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهند *TXNIP* در هسته نیز جاگیری می‌کند و باعث مهار رشد و متاستاز می‌شود. علاوه بر این نقش مهمی در توسعه سلول‌های کشنده طبیعی، مهار چرخه سلولی و تنظیم متابولیسم گلوکز و فاکتورهای التهابی دارد.<sup>۱۳-۱۵</sup> نتایج به نسبت متناقضی در

دریافت شد<sup>۳۱</sup> و بر اساس این اطلاعات، منحنی‌های مختلف مدت زمان بقا برای بیماران رسم شد. این مطالعات در مجموع شامل اطلاعات بیان ژن و مدت زمان بقا ۵۹۲ بیمار مبتلا به سرطان معده هستند. این بیماران بر اساس بیان ژن *TXNIP* در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم‌بندی شده (بهترین کات-آف کاپلان-مایر) و مدت زمان بقا آنها سنجیده و مقایسه شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن *TXNIP* در سرطان‌های مختلف، داده‌های مربوط به اطلس ژنوم سرطان (TCGA) بازیابی شد. سرطان‌هایی که تعداد نمونه آنها در هر کدام از گروه‌های سالم و سرطانی کمتر از ۱۰ نمونه بود از آنالیز کنار گذاشته شد. در نهایت تغییرات بیان ژن *TXNIP* در کارسینوم اوروتلیال مثانه (BLCA)، کارسینوم تهاجمی پستان (BRCA)، آدنوکارسینوم کولون (COAD)، کارسینوم مری (ESCA)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سر و گردن (HNSC)، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه (KICH)، کارسینوم سلول رنال کلیه (KIRC)، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه (KIRP)، کارسینوم هیپاتوسلولار کبد (LIHC)، آدنوکارسینوم ریه (LUAD)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی ریه (LUSC)، آدنوکارسینوم پروستات (PRAD)، آدنوکارسینوم رکتال (READ)، کارسینوم تیروئید (THCA)، آدنوکارسینوم معده (STAD) و کارسینوم اندومترال رحم (UCEC) بررسی شد.<sup>۳۲</sup> جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد. برای تعیین معنادار بودن تغییرات بیان ژن از آزمون آماری تی جفت شده برای نمونه‌های توموری و حاشیه توموری به دست آمده از یک بیمار و از آزمون آماری تی جفت نشده برای نمونه‌های توموری و سالم بیماران مختلف استفاده شد. برای بررسی ارتباط میزان بیان ژن *TXNIP* با ویژگی‌های دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران از آزمون کای اسکور استفاده شد. همچنین برای تعیین معنادار بودن تفاوت مدت زمان بقا در بیماران با بیان بالا و پایین ژن *TXNIP* از منحنی کاپلان-مایر و آزمون منتل-کاکس استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط بیان بین ژن *TXNIP* با ژن‌های دیگر از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. در تمامی موارد  $P < 0.05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

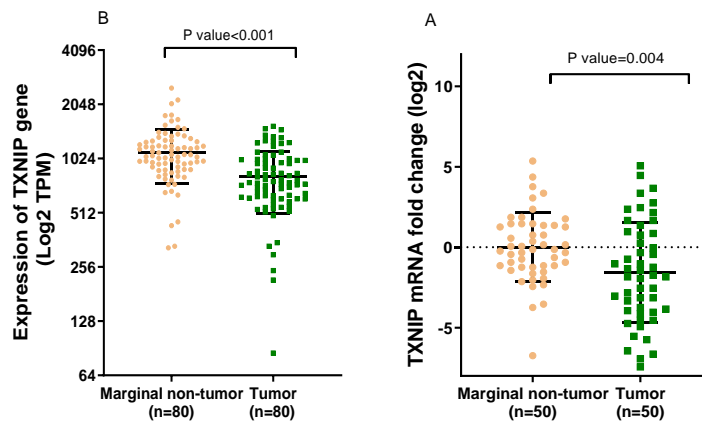
### یافته‌ها

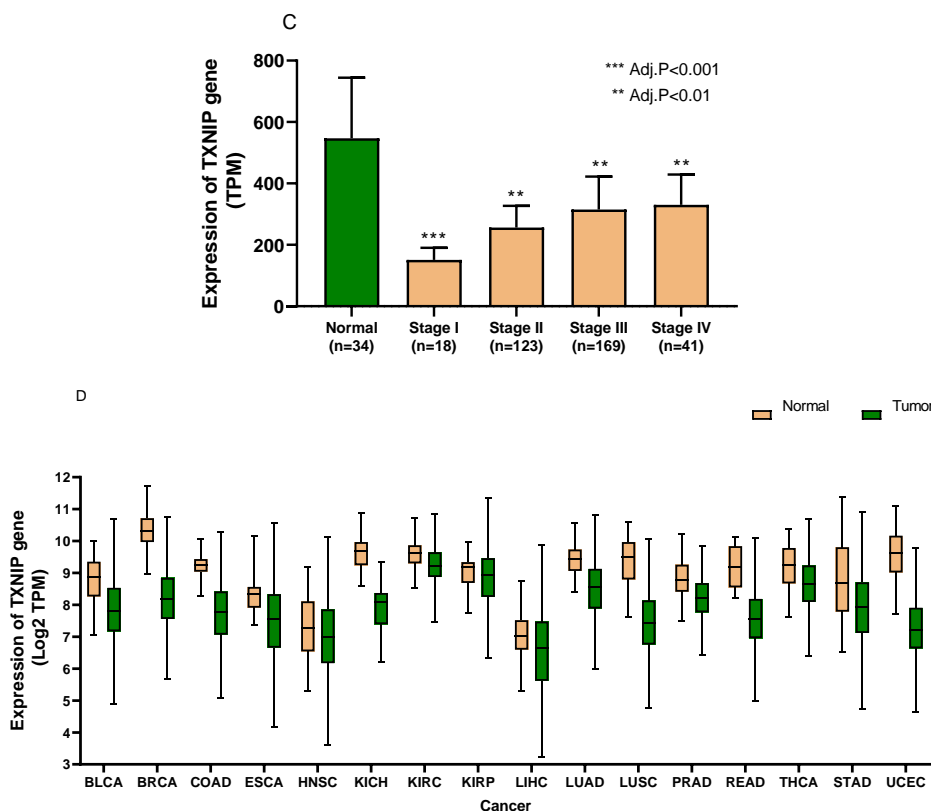
در مطالعه حاضر تغییرات بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های توموری و بافت حاشیه تومور ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان معده بررسی شد. میانگین سنی این بیماران ۶۳ سال و شامل ۳۲ مرد و ۱۸ زن بود. بررسی تغییرات کمی بیان این ژن نشان داد، میزان بیان آن در نمونه‌های تومور پایین‌تر از بافت حاشیه تومور است، طوری که میانگین میزان بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های حاشیه

نگهداری شد. سطوح بیان ژن‌ها با تکنیک qRT-PCR و به وسیله ترموسایکلر استپ‌وان‌پلاس (StepOnePlus) شرکت اپلاید بیوسیستمز (Applied Biosystems، آمریکا) اندازه‌گیری شد. حجم نهایی هر کدام از واکنش‌ها ۲۰ میکرولیتر بود که شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس بیوفکت، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب (۵/۰ میکرومولار)، ۶ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز و همچنین ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده بود. دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در ادامه ۴۰ چرخه تکثیر شامل دنا تورا سیون در دمای ۹۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و اتصال و طویل سازی در دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. در نهایت در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد منحنی ذوب بررسی شد. کمی‌سازی نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  انجام شد. در این تحقیق بر اساس مطالعات قبلی از ژن *GAPDH* به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. با توجه به توالی ژن‌های انسانی و با استفاده از ابزار پرایمر بلاست (Primer BLAST) و سایت NCBI پرایمر طراحی شد (جدول ۱). برای بررسی بیشتر تغییرات بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های سالم و سرطانی از دو پایگاه داده بیوانفورماتیکی دیگر استفاده شد. در ابتدا خوانش‌های توالی‌یابی مربوط به ۸۰ جفت نمونه آدنوکارسینوم معده و بافت سالم مجاور آن از پایگاه داده GEO (Gene Expression Omnibus) بازیابی گردید. پس از مراحل کنترل کیفی داده‌ها و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین، از نرم‌افزار Hisat2 جهت مکان‌یابی این خوانش‌ها روی ژنوم مرجع استفاده شد. جهت تخمین دقیق‌تر میزان بیان ژن، خوانش‌های دوتایی با نرم‌افزار Mark Duplicate حذف شدند.<sup>۳۰</sup> در نهایت میزان بیان ژن *TXNIP* در هر کدام از نمونه‌ها بر حسب تعداد نسخه در هر میلیون خوانش (Transcript Per Million, TPM) محاسبه گردید. جهت بررسی همبستگی بیان ژن *TXNIP* با دیگر ژن‌ها، ارتباط بیان این ژن در ۱۶۰ نمونه با سایر ژن‌ها بررسی شد. در نهایت ۴ ژن با بیشترین میزان همبستگی مثبت و منفی گزارش شد. همچنین میزان بیان ژن *TXNIP* در ۳۵ بافت سالم معده و ۳۶۱ بافت سرطانی معده از پایگاه داده اطلس ژنوم سرطان (The Cancer Genome Atlas, TCGA) بازیابی شده و میزان بیان این ژن در مراحل مختلف سرطان بررسی شد. با توجه به گذشت مدت زمان محدود از نمونه‌گیری‌های بالینی، امکان انجام آنالیزهای بقا روی این بیماران وجود نداشت. به همین دلیل اطلاعات میزان بیان ژن *TXNIP* و مدت زمان بقا بیماران مبتلا به سرطان معده مربوط به مطالعه‌های GSE15459، GSE29272، GSE14210، GSE51105 و GSE22377 از پایگاه داده کاپلان-مایر

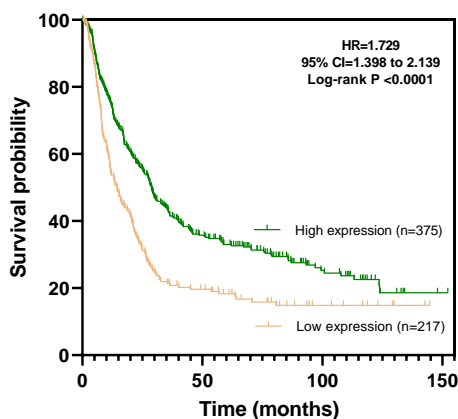
مطابق شکل ۲، اختلاف معناداری در مدت زمان بقا بین بیماران با بیان بالای ژن *TXNIP* با بیماران با بیان پایین‌تر مشاهده می‌شود. بیان پایین‌تر این ژن همراه با کاهش مدت زمان بقا برای بیماران مبتلا مطالعه ما نشان داد که میانگین مدت زمان بقا برای بیماران مبتلا به سرطان معده با بیان بالای این ژن، ۲۸/۸ ماه و برای بیماران با بیان پایین این ژن، ۱۴/۴ ماه است. برای بررسی هم‌بستگی (Co-expression) مثبت و منفی ژن *TXNIP* با ژن‌های دیگر، همبستگی بین بیان آنها بررسی شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که چهار ژن *CBX7*، *TOR1AIP1*، *WLS* و *RAB5B* به ترتیب بیشترین همبستگی مثبت بیان را با ژن *TXNIP* دارند، در مقابل ژن‌های *GTSE1*، *YIF1B*، *CDC45* و *CDCA3* به ترتیب بالاترین همبستگی منفی بیان را با ژن *TXNIP* نشان دادند (شکل ۳). برای بررسی ارتباط میان ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیکی بیماران با میزان بیان ژن *TXNIP*، نمونه‌های توموری بیماران بر اساس میانه بیان این ژن در دو گروه بیان بالا و بیان پایین تقسیم‌بندی شدند. سپس ارتباط بین متغیرهای مختلف و میزان بیان سنجیده شد. بر این اساس ۲۵ بیمار در گروه بیان بالا و ۲۵ بیمار در گروه بیان پایین قرار گرفتند. طبق جدول ۲ ارتباط معناداری بین میزان بیان این ژن و متغیرهای دموگرافیک شامل سن، جنس، مصرف سیگار و الکل، محل اولیه تومور و اندازه اولیه تومور دیده نشد. در طرف مقابل ارتباط معناداری میان بیان کاهش یافته ژن *TXNIP* و متاستاز ( $P=0/01$ ) دیده شد. کاهش بیان این ژن با کاهش سطح تمایز تومور نیز ارتباط داشت ( $P=0/0072$ ). همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد ارتباط معناداری بین مصرف مواد مخدر و کاهش بیان این ژن وجود دارد ( $P=0/0416$ ).

تومور ۳ برابر نمونه‌های توموری بود. از طرفی آنالیز آماری این نتایج نشان داد که این میزان کاهش در بیان این ژن از نظر آماری معنادار ( $P=0/004$ ) است (شکل ۱-۱). همچنین برای بررسی تغییرات بیان این ژن در سرطان معده، داده‌های بیانی دو مطالعه دیگر بازیابی شد. بررسی تغییرات بیان ژن *TXNIP* با استفاده از آنالیز داده‌های سکاس RNA مربوط به ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان معده نیز نشان داد، میزان بیان این ژن در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه تومور کاهش معناداری دارد (شکل ۱-۱). نتایج آنالیزها نشان دادند که بیان این ژن در نمونه‌های توموری بیماران نسبت به نمونه‌های طبیعی، پایین‌تر بوده و در تمام مراحل بیماری سرطان معده نسبت به بافت مجاور تومور کاهش معناداری دارد (شکل ۱-۱). در نهایت برای ارائه دید کلی‌تر از نقش این ژن در سرطان‌های مختلف، بیان این ژن در چندین سرطان بررسی شد. طبق شکل ۱-۱، نتایج ما نشان داد در تمام موارد بررسی شده شامل کارسینوم اوروتلیال مثانه، کارسینوم تهاجمی پستان، آدنوکارسینوم کولون، کارسینوم مری، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سر و گردن، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه، کارسینوم سلول رنال کلیه، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه، کارسینوم هیپاتوسلولار کبد، آدنوکارسینوم ریه، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی ریه، آدنوکارسینوم پروستات، آدنوکارسینوم رکتال، کارسینوم تیروئید، آدنوکارسینوم معده و کارسینوم اندومتريال رحم، ژن *TXNIP* به صورت کاهش تنظیم می‌شود. با استفاده از آنالیز محنی بقا، ارتباط میان بیان ژن *TXNIP* و پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شد. بیماران در دو گروه بیان بالا و بیان پایین ژن تقسیم‌بندی شده و مدت زمان بقا آنها بررسی شد.



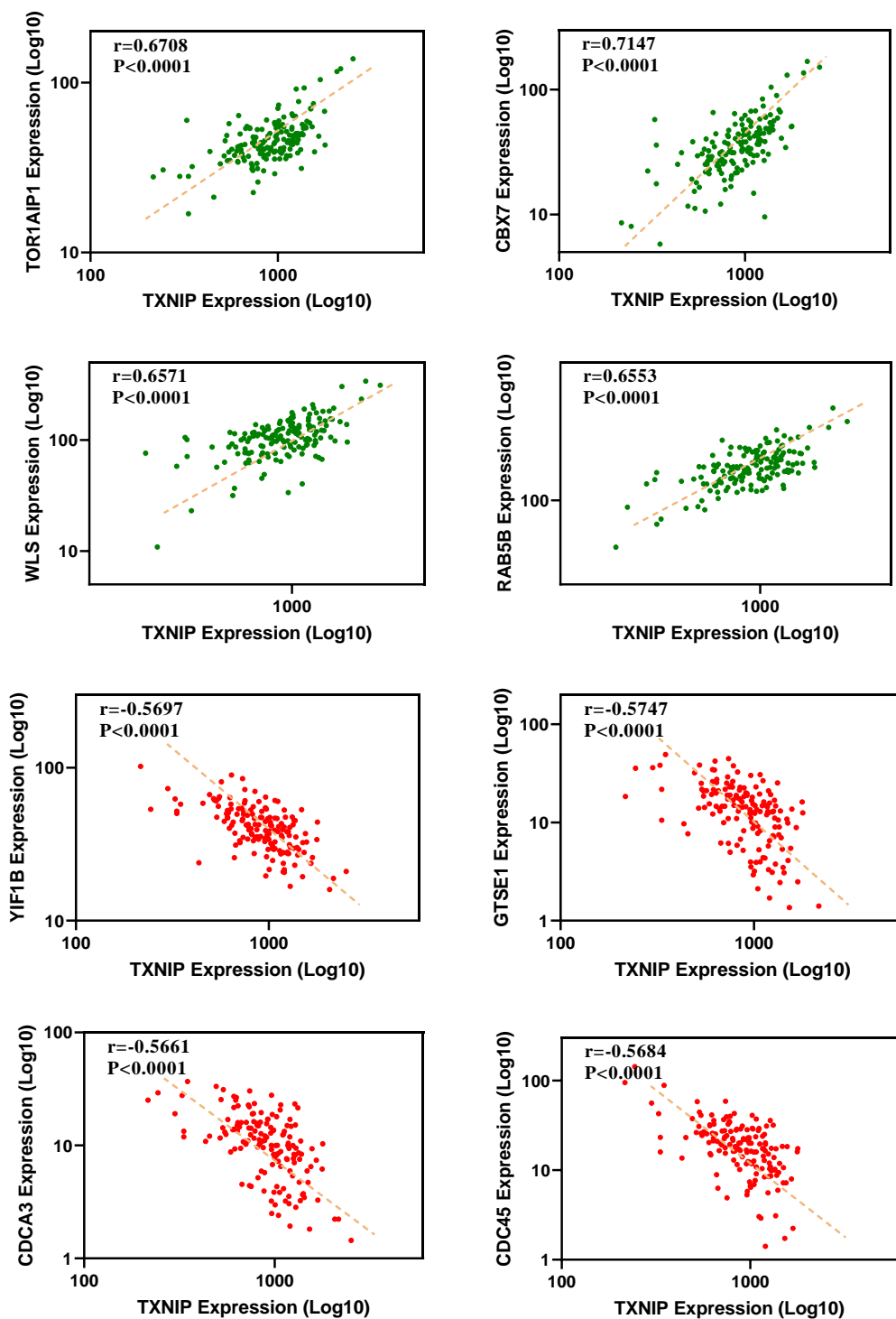


**شکل ۱.** میزان بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های تومور بیماران یک سوم نمونه‌های حاشیه تومور است و آنالیز آماری نشان می‌دهد این میزان کاهش بیان معنادار است (A). بیان ژن *TXNIP* در ۸۰ جفت نمونه تومور و حاشیه تومور از بیماران پایگاه داده GEO کاهش چشمگیری نشان می‌دهد (B). بیان این ژن در تمام مراحل سرطان معده در آنالیز بیوانفورماتیکی نسبت به بافت حاشیه تومور کاهش معناداری نشان می‌دهد (C). آنالیز بین سرطانی تغییرات بیان ژن *TXNIP* نشان داد میزان بیان این ژن در تمام سرطان‌های بررسی شده [کارسینوم اوروتلیال متانه (BLCA)، کارسینوم تهاجمی پستان (BRCA)، آدنوکارسینوم کولون (COAD)، کارسینوم مری (ESCA)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سر و گردن (HNSC)، کارسینوم سلول کروموفوب کلیه (KICH)، کارسینوم سلول رنال کلیه (KIRC)، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه (KIRP)، کارسینوم هیپاتوسلولار کبد (LIHC)، آدنوکارسینوم ریه (LUAD)، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی ریه (LUSC)، آدنوکارسینوم پروستات (PRAD)، آدنوکارسینوم رکتال (READ)، کارسینوم تیروئید (THCA)، آدنوکارسینوم معده (STAD) و کارسینوم اندومتر (UCEC)] به صورت کاهشی تنظیم می‌شود (D).



**شکل ۲.** احتمال بقا بیماران مبتلا به سرطان معده در دو گروه بیان بالا و پایین ژن *TXNIP*. بقا کلی بیماران با بیان بالای ژن *TXNIP* نسبت به بیماران با بیان پایین این ژن، به طور معناداری بیشتر است (log-rank P<0.0001).





شکل ۳. ژن‌های TOR1AIP1، CBX7، WLS و RAB5B به ترتیب بیشترین همبستگی مثبت بیان را با ژن TXNIP نشان دادند. در مقابل ژن‌های GTSE1، YIF1B و CDCA3 و CDC45 به ترتیب بیشترین همبستگی منفی بیان را با ژن TXNIP نشان دادند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

توالی	پرایمر	ژن
ACACCCACTCCTCCACCTTTG	رو به جلو	GAPDH
TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	رو به عقب	
GGCGGGTGTCTGTCTCTGCT	رو به جلو	TXNIP
GGCAAGGTAAGTGTGGCGGG	رو به عقب	

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

مقدار P	تعداد بیماران در گروه		متغیر
	بیان پایین	بیان بالا	
۰/۲۵۷۵	۱۵	۱۱	سن
	۱۰	۱۴	بالای ۶۳ سال زیر ۶۳ سال
۰/۵۵۵۷	۱۷	۱۵	جنس
	۸	۱۰	مرد زن
۰/۵۲۲۸	۱۷	۱۹	مصرف سیگار
	۸	۶	ندارد دارد
۰/۲۹۷۱	۲۴	۲۲	مصرف الکل
	۱	۳	ندارد دارد
۰/۰۴۱۶	۱۹	۲۴	مصرف مواد مخدر
	۶	۱	ندارد دارد
۰/۰۱	۱۷	۲۴	متاستاز
	۸	۱	ندارد دارد
۰/۸۲۱۴	۸	۸	محل تومور اولیه
	۹	۷	آنتروم
	۶	۶	بدنه معده
	۲	۴	کاردیا فوندوس
۰/۰۳۱۴	۳	۶	سطح تمایز
	۲	۹	خوب
	۱۱	۵	متوسط
	۹	۵	ضعیف بدون تمایز
۰/۳۹۴۶	۱۵	۱۲	اندازه تومور اولیه
	۱۰	۱۳	بیشتر از ۵/۸ سانتی متر کمتر از ۵/۸ سانتی متر

## بحث

داشتند، طول عمر بالاتری هم نشان دادند. با توجه به این موارد استفاده از ژن درمانی *TXNIP* برای افزایش طول عمر بیماران سرطانی به عنوان یک پیشنهاد اولیه قابل بررسی و پیگیری است. برای اطلاع از شبکه‌های تنظیم مثبت و منفی بیان این ژن، همبستگی بیان *TXNIP* با تمام ژن‌های کد کننده و غیر کد کننده بررسی و در نهایت ۴ ژن در هر کدام از گروه‌های مثبت و منفی گزارش شد. نتایج ما نشان داد ژن‌های *CBX7* و *GTSE1* به ترتیب بیشترین همبستگی بیانی مثبت و منفی را با *TXNIP* دارند. برای بررسی میزان بیان این ژن در سرطان‌های مختلف یک مطالعه بین سرطانی (pan-cancer) نیز انجام شد. مشخص شد بیان این ژن در همه سرطان‌های بررسی شده تنظیم کاهشی دارد. این یافته به همراه نتایج دیگر پیشنهاد کننده نقش مهم این ژن در پیشرفت سلول به سمت سرطانی شدن است. با توجه به این که تنظیم کاهشی در اکثر سرطان‌ها مشاهده شده است، احتمال این که کاهش بیان این ژن به عنوان علت سرطانی شدن سلول‌ها باشد بیشتر از حالتی است که معلول سرطانی شدن باشد.

## نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های توموری معده نسبت به نمونه‌های بافت حاشیه تومور کاهش می‌یابد. این کاهش بیان با متاستاز و عدم تمایز سلول‌های توموری مرتبط است. همچنین بیماران با بیان کمتر، طول عمر کوتاه‌تری نیز داشتند. مطالعه بین سرطانی، کاهش بیان این ژن در تمام سرطان‌های بررسی شده را نشان داد. این یافته‌ها نقش کلیدی ژن *TXNIP* در پیشرفت سرطان معده را نشان می‌دهند و احتمال استفاده از آن به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی دهنده (prognostic) در مدیریت این سرطان را مطرح می‌کنند.

## قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارتش جهت حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر می‌کنیم.

## مشارکت پدیدآوران

جواد بهروزی، ابراهیم حضرتی و محسن رجائی‌نژاد تهیه نمونه‌ها و طراحی آزمایش‌ها، زهرا شهبسوار حقیقی، آرزو فرهادی، سارا رفیع طاهری و جواد بهروزی اجرای آزمایش‌ها و رضا حیدری، فاطمه خدابنده‌لو و محمد فواد حیدری مشارکت در طراحی و اجرای آزمایش‌ها و تحلیل نتایج را عهده داشتند. همچنین تمام

مطالعات مختلفی *TXNIP* را به عنوان مهارکننده پیشرفت سرطان معرفی کرده‌اند.<sup>۱۹</sup> همچنین بیان پایین این ژن با تهاجم تومور، مرحله پیشرفته‌تر و پیش‌آگهی ضعیف‌تر در سرطان‌های پستان، کولون، کلیه و مثانه مرتبط است.<sup>۱۹، ۲۳</sup> افزایش بیان این ژن منجر به افزایش میزان آپوپتوز و مهار تقسیم و رشد سلولی در سرطان‌های مختلف می‌شود.<sup>۲۴</sup> در هر حال اطلاعات کمی در رابطه با تغییرات بیان این ژن در سرطان معده وجود دارد. کاهش یا از دست رفتن بیان این ژن در چندین سرطان گزارش شده است. در یک مطالعه نی‌شی زاوا و همکاران نشان دادند بیان ژن *TXNIP* در مراحل مختلف تومور مثانه کاهش می‌یابد، همچنین کاهش بیان این ژن در مدل‌های موشی امکان تومورزایی را تسهیل می‌کند.<sup>۲۵</sup> همچنین گلدبرگ و همکاران نشان دادند که بیان *TXNIP* به طور معکوسی با پیشرفت ملانوما مرتبط است.<sup>۲۶</sup> در مطالعه گائو و همکاران مشخص گردید بیان این ژن در سلول‌های کارسینوم کلیه کاهش چشمگیری نشان می‌دهد.<sup>۲۳</sup> بنابراین فرضیه نقش کلیدی کاهش بیان این ژن در سرطان، منطقی به نظر می‌آید. نتایج مطالعه ما نشان داد میزان بیان ژن *TXNIP* در نمونه‌های توموری بیماران نسبت به بافت سالم مجاور کاهش چشمگیری دارد. همچنین آنالیز بیوانفورماتیکی دو کوهورت دیگر نیز نشان داد که بیان ژن *TXNIP* در آزمایشات توالی یابی کلی ترانسکرپتوم کاهش دارد. احتمالاً کاهش بیان این ژن از طریق مکانیسم‌های تنظیم اپی‌ژنتیکی، نسخه‌برداری و یا پس از نسخه‌برداری صورت می‌گیرد.<sup>۲۷</sup> در هر حال برای مشخص شدن این موضوع به مطالعات بیشتری نیاز است. در مطالعات مختلفی بیان بالای *TXNIP* با عدم تهاجم تومور به گره‌های لنفاوی و اطراف اعصاب همراه بود و تومورها میزان تمایز خوبی از خود نشان دادند.<sup>۲۸</sup> انتقال سلول‌های دستکاری شده ژنتیکی که بیان ژن *TXNIP* افزایش یافته داشتند به مدل‌های موشی باعث کاهش میزان متاستاز در آنها می‌شود.<sup>۱۹</sup> مهار بیان این ژن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های مهار نشده، باعث افزایش رشد، مهاجرت و تهاجم سلول‌ها شد.<sup>۲۹</sup> هم‌راستا با این یافته‌ها، در مطالعه حاضر بیان پایین ژن *TXNIP* با متاستاز و عدم تمایز تومور ارتباط معناداری داشت. مطالعه گائو و همکاران نشان داد کاهش بیان ژن *TXNIP* در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول کلیوی سلول شفاف (CCRCC) با پیش‌آگهی نامطلوب این بیماری همراه است.<sup>۳۳</sup> همچنین بیان پایین این ژن با کاهش بقا کلی بیماران مبتلا به سرطان سینه در ارتباط است.<sup>۳۰</sup> مطالعه ما پیش‌آگهی خوب بیان بالای *TXNIP* را در بیماران مبتلا به سرطان معده پیشنهاد می‌کند. بیمارانی که بیان بالاتر این ژن را

### ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش با کد اخلاق IR.AJAUMS.REC.1400.278 تأیید شده است.

### تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌کنند که هیچ تعارض منافی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

نویسندگان در نگارش مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی را خوانده و تأیید کرده‌اند.

### منابع مالی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ارتش انجام شده است.

### دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در این مطالعه در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌شود.

### References

- Grabsch HI, Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Digestive surgery*. 2013;30(2):150-8. doi: 10.1159/000350876
- Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1965;64(1):31-49. doi: 10.1111/apm.1965.64.1.31
- Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012;3(3):251. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
- Shichijo S, Hirata Y. Characteristics and predictors of gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(20):2163. doi: 10.3748/wjg.v24.i20.2163
- Palli D, Galli M, Caporaso NE, Cipriani F, Decarli A, Saieva C, et al. Family history and risk of stomach cancer in Italy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1994;3(1):15-8.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-9. doi: 10.1038/25292
- Behroozi J, Shahbazi S, Bakhtiarzadeh MR, Mahmoodzadeh H. ADAR expression and copy number variation in patients with advanced gastric cancer. *BMC gastroenterology*. 2020;20(1):1-9. doi: 10.1186/s12876-020-01299-8
- Arienti C, Pignatta S, Tesi A. Epidermal growth factor receptor family and its role in gastric cancer. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1308. doi: 10.3389/fonc.2019.01308
- Chen Y, Ning J, Cao W, Wang S, Du T, Jiang J, et al. Research progress of TXNIP as a tumor suppressor gene participating in the metabolic reprogramming and oxidative stress of cancer cells in various cancers. *Frontiers in oncology*. 2020;10:568574. doi: 10.3389/fonc.2019.01308
- Filhoulaud G, Guilmeau S, Dentin R, Girard J, Postic C. Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2013;24(5):257-68. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.003
- Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(29):30369-74. doi: 10.1074/jbc.M400549200
- Shalev A. Minireview: Thioredoxin-interacting protein: regulation and function in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Molecular endocrinology*. 2014;28(8):1211-20. doi: 10.1210/me.2014-1095
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology*. 2010;11(2):136-40. doi: 10.1038/ni.1831
- Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(3):261-70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.004

15. Le Bras M, Clement M, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and histopathology*. 2005;20(1):205-19. doi: 10.14670/HH-20.205
16. Li Y, Miao L-Y, Xiao Y-L, Huang M, Yu M, Meng K, et al. Hypoxia induced high expression of thioredoxin interacting protein (*TXNIP*) in non-small cell lung cancer and its prognostic effect. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(7):2953-8. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.7.2953
17. Gunes A, Bagirsakci E, Iscan E, Cakan-Akdogan G, Aykutlu U, Senturk S, et al. Thioredoxin interacting protein promotes invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(96):36849. doi: 10.18632/oncotarget.26402
18. Jiao D, Huan Y, Zheng J, Wei M, Zheng G, Han D, et al. UHRF1 promotes renal cell carcinoma progression through epigenetic regulation of *TXNIP*. *Oncogene*. 2019;38(28):5686-99. doi: 10.1038/s41388-019-0822-6
19. Morrison JA, Pike LA, Sams SB, Sharma V, Zhou Q, Severson JJ, et al. Thioredoxin interacting protein (*TXNIP*) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer. *Molecular cancer*. 2014;13(1):1-13. doi: 10.1186/1476-4598-13-62
20. Ebbert MT, Wadsworth ME, Staley LA, Hoyt KL, Pickett B, Miller J, et al. Evaluating the necessity of PCR duplicate removal from next-generation sequencing data and a comparison of approaches. *BMC bioinformatics*. 2016;17(7):239. doi: 10.1186/s12859-016-1097-3
21. Szász AM, Lánckzy A, Nagy Á, Förster S, Hark K, Green JE, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget*. 2016;7(31):49322. doi: 10.18632/oncotarget.10337
22. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022;25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001
23. Gao Y, Qi JC, Li X, Sun JP, Ji H, Li QH. Decreased expression of *TXNIP* predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2020;19(1):763-70. doi: 10.3892/ol.2019.11165
24. Li J, Yue Z, Xiong W, Sun P, You K, Wang J. *TXNIP* overexpression suppresses proliferation and induces apoptosis in SMMC7221 cells through ROS generation and MAPK pathway activation. *Oncology reports*. 2017;37(6):3369-76. doi: 10.3892/or.2017.5577
25. Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, Kobayashi T, Saito R, Kotani H, et al. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011;32(10):1459-66. doi: 10.1093/carcin/bgr137
26. Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, et al. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and *TXNIP*. *Cancer research*. 2003;63(2):432-40.
27. Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2007;9(3):257-72. doi: 10.31887/DCNS.2007.9.3/uschibler
28. Woolston CM, Madhusudan S, Soomro IN, Lobo DN, Reece-Smith AM, Parsons SL, et al. Thioredoxin interacting protein and its association with clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Redox biology*. 2013;1(1):285-91. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.006
29. Tsubaki H, Tooyama I, Walker DG. Thioredoxin-interacting protein (*TXNIP*) with focus on brain and neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24):9357. doi: 10.3390/ijms21249357
30. Shen L, O'Shea JM, Kaadige MR, Cunha S, Wilde BR, Cohen AL, et al. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer through Myc suppression of *TXNIP*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(17):5425-30. doi: 10.1073/pnas.1501555112