

miR-146a: یک سرکوبگر احتمالی تومور در مالتیپل میلوما

شیمای کاظم زاده^۱، علیرضا فارسی نژاد^۲، جاوید صبوری تکانلو^۱، سعید کاویانی^۳، امیر آتشی^۴، مسعود سلیمانی^۵، سعید آبرون^۵

چکیده

سابقه و هدف

میکروRNAها با تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی، نقش کلیدی را در کنترل پاسخهای ایمنی، التهاب، رشد و مرگ سلولی ایفا می‌نمایند. بسیاری از میکروRNAها به عنوان انکوژن، سرکوبگر تومور و تعدیل‌کننده رشد سلول‌های بنیادی سرطانی عمل می‌نمایند. miR-146a، از میکروRNAهایی است که نقش مهمی در بروز سرطان‌ها ایفا نموده و می‌تواند به عنوان محرک رشد و یا سرکوبگر تومور عمل کند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تغییرات بیان miR-146a در رده‌های سلولی میلومایی (L363، LP1، RPMI 8226 و KMM1) در مقایسه با لکوسیت‌های طبیعی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، چهار رده سلولی میلومایی و لکوسیت‌های طبیعی جدا شده از خون محیطی فرد سالم در شرایطی معین کشت داده شد. پس از استخراج RNA از سلول‌ها، بیان miR-146a به صورت کمی با انجام RT-PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

برطبق یافته‌ها، بیان miR-146a در رده‌های میلومایی نسبت به لکوسیت‌های طبیعی به طور معناداری کاهش یافته است. آنالیز داده‌ها نشان داد که در مقایسه با لکوسیت‌های طبیعی، بیان miR-146a در رده سلولی L363 به طور میانگین $0/32 \pm 0/07$ برابر، در رده‌های LP1 به طور میانگین $0/03 \pm 0/07$ برابر و در رده‌های RPMI 8226 و KMM1 به ترتیب و به طور میانگین $0/02 \pm 0/0035$ و $0/01 \pm 0/0022$ برابر کاهش یافته است ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌ها، به نظر می‌رسد که miR-146a می‌تواند به عنوان یک سرکوبگر تومور در لکوسیت‌ها عمل نموده و کاهش بیان این میکرو RNA در سلول‌های میلومایی به احتمال زیاد در پیدایش و یا پیشرفت مالتیپل میلوما مؤثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: مالتیپل میلوما، میکرو RNA ها، miR-146a انسانی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۲- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار گروه هماتولوژی و علوم آزمایشگاهی - دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

۴- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود - شاهرود - ایران

۵- PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

مقدمه

مالتیپل میلوما، نوعی بدخیمی است که با تکثیر کلونال پلاسما سل‌ها در مغز استخوان و افزایش تولید ایمنوگلوبولین‌های مونوکلونال مشخص می‌گردد (۱). ناهنجاری‌های سیتوژنتیکی و مولکولی مختلف سبب بروز مالتیپل میلوما می‌شوند (۲). پس از لنفوما، مالتیپل میلوما دومین بدخیمی خونی شایع در جهان است (۳). تلاش‌های بسیاری در جهت افزایش بقای بیماران مبتلا به مالتیپل میلوما صورت گرفته است. پیشرفت‌های اخیر در علم بیولوژی سلولی و مولکولی با توسعه روش‌های درمانی نوین در سرطان‌ها همراه بوده است. در این روش‌ها اختلالات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در مسیرهای پیام‌دهی، به ویژه مسیرهای مؤثر در پاتوژنز بدخیمی، به عنوان هدف‌های درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. شناسایی میکرو RNA ها و تعیین نقش آن‌ها در تنظیم بیان ژن، زمینه‌ای مناسب در درک هر چه بیشتر بیولوژی سلول‌های سرطانی و تعیین درجه بدخیمی آن‌ها فراهم آورده است (۴). الگوهای بیان میکرو RNA ها در چندین بدخیمی خونی هم چون لوسمی مزمن لنفوئیدی (CLL) و لوسمی حاد میلوئیدی (AML) تا حد زیادی مشخص شده است (۵-۸). به علاوه همبستگی چندین میکرو RNA با زیر گروه‌های ژنتیکی لوسمی‌های حاد و CLL تعیین گردیده است (۹-۱۱). این در حالی است که اطلاعات به دست آمده در این زمینه در مورد مالتیپل میلوما محدود می‌باشد (۱۲، ۱۳). مطالعه‌های اخیر مؤید نقش کلیدی میکرو RNA ها در مالتیپل میلوما است، به گونه‌ای که نه تنها در پیشرفت بدخیمی، بلکه در شروع آن، که به دنبال متیلاسیون میکرو RNA های مهارکننده تومور است، مؤثر می‌باشند (۱۴).

میکرو RNA ها گروهی از RNA های تک رشته‌ای کوتاه (۲۳-۲۰ نوکلئوتیدی) هستند که بیان ژن را کنترل می‌نمایند. این RNA های غیرکد کننده کوچک با شرکت در کمپلکس RISC (RNA-induced silencing complex)، سبب اتصال کمپلکس مذکور به نواحی مکمل در 3' UTR در mRNA های هدف شده و با تخریب و یا مهار mRNA هدف، بیان ژن را در سطح پس از رونویسی (post-)

transcriptional)، کنترل می‌نمایند. مطالعه‌های انجام شده بر نقش میکرو RNA ها در فرآیندهای مهم بیولوژیکی از جمله پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی، التهاب، رشد و مرگ سلولی تاکید دارند (۱۶، ۱۵، ۴). علاوه بر این، بسیاری از میکرو RNA ها به عنوان انکوژن، سرکوبگر تومور و حتی تعدیل کننده رشد سلول‌های بنیادی سرطانی و متاستاز عمل می‌نمایند (۱۷).

miR-146a از جمله میکرو RNA هایی است که نقش مهمی در بروز بیماری‌های التهابی و سرطان‌های گوناگون ایفا می‌کند. miR-146 نخستین بار به عنوان یک تنظیم‌گر سیستم ایمنی در پاسخ به عفونت‌های میکروبی شناسایی گردید. بررسی‌های بیشتر نشان داد که miR-146a/b در مسیر وابسته به NF-kB قرار داشته و توسط TLR القا می‌گردد. این میکرو RNA با هدف قرار دادن دو پروتئین ضروری در مسیر انتقال پیام پیش‌التهابی به نام‌های TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) و IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1)، مسیر NF-Kb را مهار می‌نماید (۱۸، ۱۳). مطالعه‌های گسترده‌ای در زمینه نقش miR-146a در پاتوژنز سرطان‌های گوناگون صورت گرفته که جمع‌بندی نتایج این بررسی‌ها نشان‌دهنده نقش دوگانه miR-146a در سرطان‌ها است. به عبارت دیگر، بسته به ماهیت سلول‌های بدخیم و مسیرهای انتقال پیام فعال شده که miR-146a در آن‌ها دخیل است، میکرو RNA مذکور نقش انکوژنی و یا مهارکنندگی تومور را ایفا می‌نماید (۲۰، ۱۹).

با توجه به اهمیت میکرو RNA ها در بیولوژی سرطان، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تغییرات بیان miR-146a به عنوان یکی از عوامل ژنتیکی کلیدی در شروع و پیشرفت بدخیمی، انجام گرفت. به همین منظور میزان بیان miR-146a در رده‌های سلولی مرتبط با مالتیپل میلوما (L363، LP1، RPMI 8226 و KMM1) اندازه‌گیری و با لوکوسیت‌های طبیعی خون مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

کشت سلول:

در مطالعه تجربی حاضر، چهار رده سلولی LP1، L363،

جهت ارزیابی کمی و تعیین غلظت RNA تخلیص شده، جذب نوری RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific NanoDrop TM ND-2000c) خوانده شد. به منظور تعیین درجه خلوص RNA تخلیص شده، جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر نیز سنجیده شد. در مرحله بعد، جهت ارزیابی کیفیت RNA تخلیص شده، مقدار ۱ میکرولیتر از RNA تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد.

ساخت cDNA:

ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت کیاژن (QuantiTect® Reverse Transcription kit, QIAGEN) و آغازگرهای Stem-loop اختصاصی برای miR-146a و SNORD-47 (به عنوان کنترل داخلی) و با انجام واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR) انجام گرفت. توالی آغازگرهای Stem loop اختصاصی برای miR-146a به صورت:

GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGC
ACTGCATACGACAACCCAT

و برای SNORD-47 به صورت:

GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGC
ACTGCATACGACAACCTC

کیت مربوطه، مخلوط واکنش تهیه گردید و سپس واکنش رونویسی معکوس با برنامه دمایی زیر انجام گرفت:

۱۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد. آغازگرهای استفاده شده در Real Time PCR از مرکز تحقیقات و فناوری بن یاخته تهیه شد.

Real Time PCR:

به منظور ارزیابی کمی بیان miR-146a در نمونه‌های آزمایش و کنترل، روش Real Time PCR با توجه به دستورالعمل کیت مربوطه انجام گرفت. بدین منظور، مخلوطی از SYBR® Green RT-PCR Master Mix (آمپلیکون، دانمارک)، آغازگرهای جلوبرنده اختصاصی

RPMI 8226 و KMM1 به عنوان گروه آزمایش و لکوسیت‌های جدا شده از خون فرد سالم به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. از آن جا که رده‌های سلولی میلومایی دارای ترانس لوکاسیون‌ها و موتاسیون‌های متعددی هستند، در این مطالعه، چهار رده سلولی میلومایی متفاوت (RPMI 8226، LP1، L363، KMM1) مورد بررسی قرار گرفت تا امکان تعمیم نتایج به دست آمده وجود داشته باشد. تمامی رده‌های سلولی فوق‌الذکر در محیط کشت RPMI 1640 (آمریکا، جیبکو) حاوی ۱۰٪ FBS (آمریکا، جیبکو) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (آمریکا، جیبکو)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. زمانی که سلول‌ها به پاساژ دوم رسیدند، جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی لکوسیت‌ها از خون محیطی فرد سالم:

برای این منظور مقدار ۳ میلی‌لیتر خون حاوی ضد انعقاد EDTA با ۳ میلی‌لیتر PBS رقیق شد، سپس خون رقیق شده به آرامی بر روی ۳ میلی‌لیتر فایکول قرار گرفت و با سرعت ۴۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) = Peripheral Blood Mononuclear Cells که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده تجمع پیدا کرده بودند، به آرامی جمع‌آوری گردید. به منظور حذف فایکول، PBMC جدا شده سه مرتبه با PBS شسته شده و رسوب سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به صورت سوسپانسیون در آمد. تعداد PBMC جداسازی شده با استفاده از لام نئوبار تعیین گردید.

استخراج Total RNA:

به منظور تخلیص RNA سلولی، از کیت RNXTM - PLUS (ایران، سیناژن) که بر پایه اختلاف فاز فنل-کلروفرم عمل می‌کند، استفاده شد. بر طبق دستورالعمل کیت مربوطه، RNA از چهار رده سلولی مورد آزمایش استخراج شده و رسوب RNA در ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب DEPC (Diethylpyracarbonate) (و یا آب مقطر فاقد آنزیم

جدول ۱: توالی آغازگرهای Real time PCR

دمای اتصال (°C)	توالی آغازگر	
۶۰	F- 5'TCCGTGAGAACTGAATTCC-3'	miR-146a
۶۰	F-5'ATCACTGTAAAACCG TTCCA-3'	SNORD-47
۶۰	R-5'GAGCAGGGTCCGAGGT-3'	Common Reverse

PCR با برنامه دمایی روبرو انجام گرفت: ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد (جدول ۱). به منظور آنالیز داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار ۱۸ SPSS و آزمون Paired-Samples t test استفاده شد.

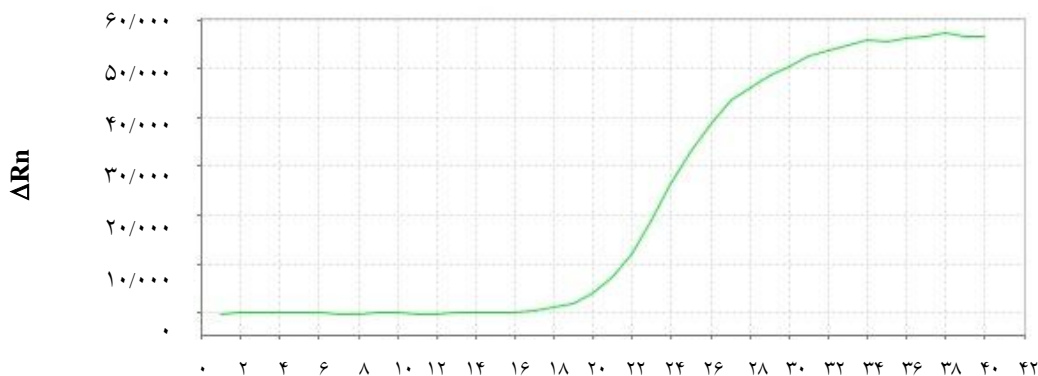
یافته‌ها

ارزیابی بیان *miR-146a* در رده‌های سلولی میلومایی و لکوسیت‌های طبیعی:

در مطالعه حاضر، تخلیص RNA از نمونه‌های میلومایی (سلول‌های چهار رده L363، LPI، RPMI و KMM1) و نمونه کنترل (لکوسیت‌های طبیعی خون)، ساخت cDNA از RNAهای تخلیص شده و بررسی کمی بیان *miR-146a* با روش RT-PCR در شرایطی یکسان صورت گرفت.

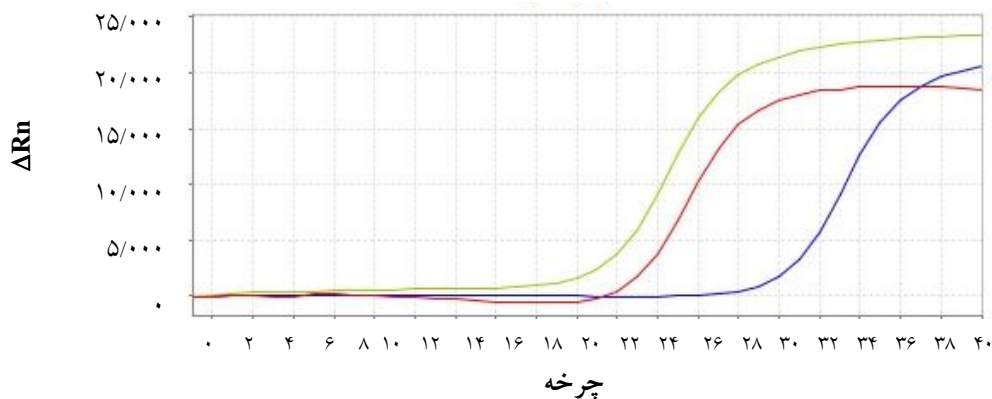
برای *miR-146a* (و یا SNORD-47) و آغازگر معکوس مشترک، رنگ ROX، cDNA و آب فاقد آنزیم RNase بر روی یخ تهیه شده و پس از اسپین کوتاه، به دستگاه RT-PCR StepOne™ انتقال یافتند. واکنش RT-

نمودار تکثیر



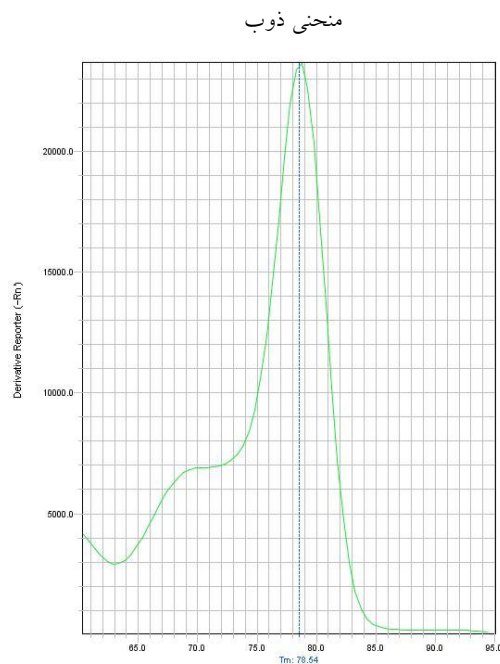
چرخه

نمودار تکثیر

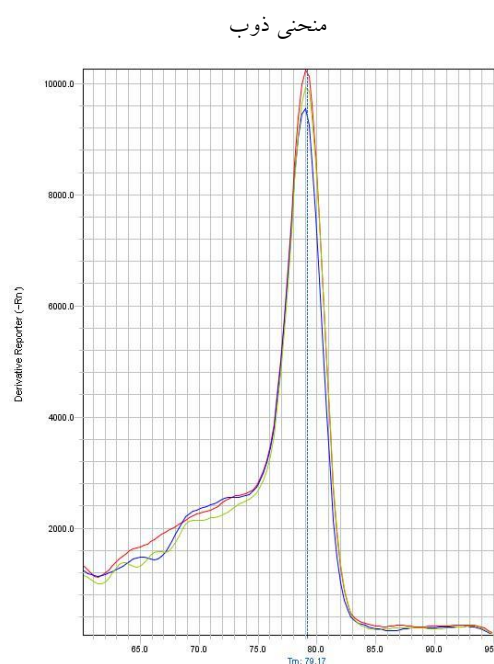


چرخه

نمودار ۱: نمودار بالا مربوط به منحنی تکثیر *miR-146a* در لکوسیت‌های طبیعی خون است و نمودار پایین، منحنی تکثیر *miR-146a* در رده‌های سلولی میلومایی را نشان می‌دهد.



دما (درجه سانتی گراد)



دما (درجه سانتی گراد)

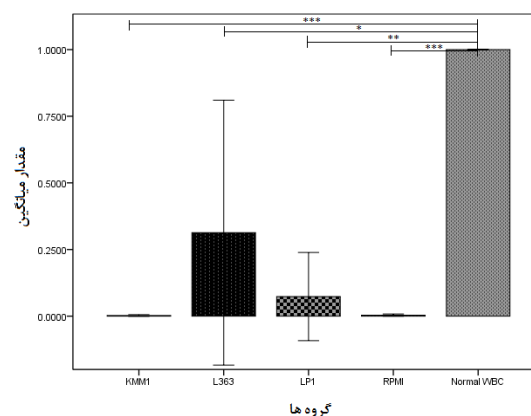
نمودار ۲: نمودار سمت راست منحنی ذوب miR-146a در رده‌های سلولی میلومایی (Tm: 79.17) و نمودار سمت چپ منحنی ذوب miR-146a در لکوسیت‌های طبیعی خون (Tm: 78.54) را نشان می‌دهد.

با فرض برابری راندمان تکثیر (Efficiency) بین ژن مورد نظر و ژن مرجع، مقایسه انجام می‌شود.

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که بیان miR-146a در چهار رده سلولی میلومایی نسبت به لکوسیت‌های طبیعی خون به طور قابل توجهی کاهش یافته است (نمودار ۳). آنالیز داده‌های RT-PCR نشان دهنده کاهش بیان معنادار miR-146a در رده سلولی L363 نسبت به لکوسیت‌های طبیعی خون است ($p = 0.03$). در رده سلولی مذکور، کاهش بیان به طور میانگین 0.32 ± 0.2 برابر گزارش شد. در رده سلولی LP1 نیز کاهش بیان miR-146a معنادار بوده و به طور میانگین 0.03 ± 0.07 برابر است ($p = 0.002$). کاهش بیان معنادار miR-146a در رده‌های سلولی RPMI و KMM1 نسبت به لکوسیت‌های طبیعی خون به ترتیب و به طور میانگین 0.035 ± 0.02 و 0.022 ± 0.01 برابر مشاهده شد ($p = 0.001$).

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر کاهش بیان معنادار miR-146a را در سلول‌های رده میلومایی نسبت به لکوسیت‌های



نمودار ۳: ارزیابی کمی بیان miR-146a در رده‌های سلولی میلومایی و لکوسیت‌های نرمال با Real Time PCR

منحنی تکثیر miR-146a در لکوسیت‌های طبیعی خون و سلول‌های میلومایی و منحنی ذوب miR-146a در این سلول‌ها در نمودار نشان داده شده است (نمودارهای ۱ و ۲).

جهت آنالیز داده‌های به دست آمده و سنجش نسبی بیان miR-146a، از مدل $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. در این روش

سرکوبگری تومور برای میکرو RNA های دیگری از جمله miR-let-7b-5p ، miR-186 ، miR-125b ، miR-145 ، miR-181a/b ، miR-222 ، miR-221 ، miR-382 ، miR-15a ، miR-16 ، miR-137/197 ، miR-29b ، miR-152 ، miR-10b-5p و miR-34c-3p در مالتیپل میلوما گزارش شده است (۲۳). از طرفی، با نگاهی به مطالعه‌های انجام شده می‌توان به آسانی دریافت که میکرو RNA ها با شرکت در فرآیندهای مهم بیولوژیکی از جمله پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی، التهاب، سرنوشت سلولی، تکثیر، مرگ و مسیرهای انتقال پیام، نقشی کلیدی را در تکامل و عملکرد سلول‌های ایمنی ایفا می‌نمایند (۱۶، ۱۵، ۴). یکی از میکرو RNA های مهم در سلول‌های ایمنی، miR-146a است که تغییر در الگوی بیانی این میکرو RNA در بیماری‌های التهابی و سرطان‌های گوناگون به چشم می‌خورد. بر اساس مطالعه‌های بولدین و همکارانش در سال ۲۰۱۱، با تکامل و فعال شدن سلول‌های ایمنی، بیان miR-146a در این سلول‌ها به شدت افزایش می‌یابد، به همین دلیل حذف هدفمند miR-146a، نقایص ایمنی مختلفی را به دنبال خواهد داشت. از سوی دیگر، miR-146a در کنترل تکثیر و تمایز سلول‌های ایمنی دخیل می‌باشد، به گونه‌ای که موش‌های پیر فاقد miR-146a تولید مفرطی از سلول‌های میلوئیدی را داشته و در ارگان‌های لنفاوی ثانویه این موش‌ها، تومورهای متعددی قابل ردیابی است. نتایج فوق مؤید نقش کلیدی miR-146a به عنوان یک سرکوبگر تومور در سیستم ایمنی و هم چنین مهارکننده مولکولی (molecular brake) در التهابات، تکثیر سلول‌های میلومایی و ترانسفورماسیون انکوژنی است (۲۰). در کنار پتانسیل مهارکنندگی تومور، گروهی از مطالعه‌ها به نقش انکوژنی miR-146a در بدخیمی‌های خونی و تومورهای توپر اشاره دارند. برای مثال، بررسی‌های استراسزینوسکی و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که افزایش بیان miR-146a در ALL کودکان، AML، سرطان‌های سینه، پانکراس و پروستات دیده می‌شود (۲۴، ۳). به منظور روشن‌تر شدن نقش miR-146a در تقویت پتانسیل تومورزایی، گروهی از محققان به بررسی مسیرهای انتقال پیام پایین دست و بالا دست miR-146a پرداختند. بر طبق یافته‌های مطالعه‌های

طبیعی خون نشان می‌دهد. مطالعه‌ها حاکی از آن است که miR-146a نقشی مهم و کلیدی را در پاتوژنز سرطان‌ها ایفا می‌کند و از یک سو با تقویت پتانسیل تومورزایی به عنوان یک آنکوژن عمل کرده و از سوی دیگر با اثر بر قدرت تکثیر، تمایز و تهاجم سلول‌ها، مانع از رشد تومور می‌گردد. نوع و ماهیت سلول‌های بدخیم و هم چنین مسیرهای انتقال پیام فعال شده که miR-146a در آن‌ها دخیل است، تعیین‌کننده تاثیر مثبت و یا منفی میکرو RNA مذکور بر رشد سلول‌های سرطانی است (۲۰). با تکیه بر نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که miR-146a به عنوان یک سرکوبگر تومور در لکوسیت‌ها عمل می‌کند. به عبارت دیگر، سلول‌های میلومایی از طریق کاهش بیان miR-146a بر فعالیت سرکوبگر توموری میکرو RNA مذکور غلبه کرده و موجب پیشرفت بدخیمی می‌گردند. مسأله مورد سؤال این است که کاهش بیان miR-146a در پلاسماسل‌ها یک رویداد اولیه بوده و سبب شروع میلوما می‌گردد و یا این که یک رویداد ثانویه است و در پیشرفت بدخیمی دخالت دارد. این موضوع لزوم بررسی‌های تکمیلی در زمینه نقش miR-146a در مالتیپل میلوما و مسیرهای انتقال پیام پایین دست آن را خاطر نشان می‌نماید.

شیوع بالای مالتیپل میلوما در جهان و درصد بالای مرگ و میر ناشی از آن که به دلیل غیر قابل درمان بودن بدخیمی رخ می‌دهد و هم چنین طولانی و پر هزینه بودن دوره درمان، لزوم تشخیص بیماری در مراحل اولیه و تعیین به موقع پیش‌آگهی بیماری را خاطر نشان می‌نماید (۲۱). از طرفی، پیشرفت‌های اخیر در علم بیولوژی سلولی و مولکولی سبب توسعه روش‌های درمانی نوین در سرطان‌ها گردیده است. در این روش‌ها، اختلالات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در مسیرهای پیام‌دهی، به ویژه مسیرهای مؤثر در پاتوژنز بدخیمی، به عنوان هدف‌های درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. درمان‌های بر پایه اپی‌ژنتیک به ویژه هدف قرار دادن میکرو RNA ها، یک رویکرد درمانی نوین در مالتیپل میلوما به شمار می‌آید (۴). از این رو مطالعه‌های گسترده‌ای در زمینه شناسایی و تعیین عملکرد میکرو RNA های مؤثر در مالتیپل میلوما صورت گرفته است (۲۲). همانند نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، نقش

انجام شده، القای بیان miR-146a در سلول با مهار رونویسی از دو مولکول عملگر مهم در مسیر NF- κ B به نام های IRAK1 و TRAF6، سبب کنترل منفی مسیر NF- κ B می گردد. غیر فعال شدن مسیر انتقال پیام مذکور با مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول ها همراه است. به عبارت دیگر، miR-146a قادر است تا با مهار کردن مسیر NF- κ B در سلول های سرطانی، به عنوان یک مهارکننده رشد تومور عمل نماید (۲۶، ۲۵). از سویی، جمع بندی یافته های مطالعه های انجام شده به نقش مسیر TGF β /SMAD4 به عنوان سرکوبگر رشد تومور در بسیاری از سرطان ها اشاره دارد. به طوری که مشاهده شده که با غیر فعال شدن SMAD4، به واسطه تاثیر میکرو RNA های مشخص بر آن و یا در اثر موتاسیون های صورت گرفته در ژن SMAD4، مسیر TGF β مهار می گردد که این امر، پیشرفت بدخیمی را به دنبال خواهد داشت. با توجه به نقش تنظیمی miR-146a بر بیان ژن SMAD4، احتمال می رود که miR-146a با کاهش سطح پروتئینی SMAD4 و مهار مسیر TGF β به عنوان یک محرک رشد تومور در سرطان ها عمل نماید (۲۸، ۲۷). در مجموع، روشن شدن این موضوع که miR-146a با تاثیر بر کدام مسیرهای انتقال پیام، از رشد و تکثیر سلول های میلومایی ممانعت نموده و سبب افزایش آپوپتوز در این سلول ها می گردد، مستلزم بررسی های بیشتر در این زمینه می باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب بخشی از پایان نامه دانشجویی و با مساعدت های مالی دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس انجام گرفت است. از آقایان دکتر مسعود سلیمانی، امیر آتشی، نادر وظیفه شیران و فخرالدین صبا جهت مساعدت در تامین مواد و رده های سلولی نهایت تشکر به عمل آورده می شود.

نتیجه گیری

از آن جا که miR-146a به عنوان یکی از میکرو

References:

- de Mel S, Lim SH, Tung ML, Chng WJ. Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 232546.
- Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona F, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010; 24(3): 629-37.
- Ocio E, Richardson P, Rajkumar S, Palumbo A, Mateos M, Orłowski R, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014; 28(3): 525-42.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(32): 11755-60.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(39): 13944-9.
- Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111(10): 5078-85.
- Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 2008; 105(40): 15535-40.
- 9- Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(10): 3945-50.
 - 10- Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, Taccioli C, Costinean S, Aguda BD, *et al.* Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2009; 114(18): 3872-9.
 - 11- Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrózek K, Ruppert AS, Paschka P, *et al.* MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2008; 358(18): 1919-28.
 - 12- Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, *et al.* MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. Blood 2009; 113(26): 6669-80.
 - 13- Suzuki Y, Kim HW, Ashraf M, Haider HK. Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF- κ B-dependent miR-146a expression by targeting Fas. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010; 299(4): H1077-82.
 - 14- Yuan Y, Kasar S, Underbayev C, Prakash S, Raveche E. MicroRNAs in Acute Myeloid Leukemia and Other Blood Disorders. Leuk Res Treatment 2012; 2012: 603830.
 - 15- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6(4): 259-69.
 - 16- Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. Cell 2012; 149(3): 515-24.
 - 17- Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(8): 1273-81.
 - 18- Omrane I, Kourda N, Stambouli N, Privat M, Medimegh I, Arfaoui A, *et al.* MicroRNAs 146a and 147b biomarkers for colorectal tumor's localization. Biomed Res Int 2014; 2014: 584852.
 - 19- Hasani SS, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Naderi M, Omrani M, Sheybani-Nasab M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. Tumour Biol 2014; 35(1): 219-25.
 - 20- Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, *et al.* miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. J Exp Med 2011; 208(6): 1189-201.
 - 21- Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, *et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. Blood 2008; 111(5): 2516-20.
 - 22- Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. J Physiol Biochem 2011; 67(1): 129-39.
 - 23- Sun CY, She XM, Qin Y, Chu ZB, Chen L, Ai LS, *et al.* miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. Carcinogenesis 2013; 34(2): 426-35.
 - 24- Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, Lam J, Chari R, Wegrzyn J, *et al.* Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. Blood 2011; 117(2): 595-607.
 - 25- Liu R, Liu C, Chen D, Yang WH, Liu X, Liu CG, *et al.* Foxp3 controls an miR-146/NF- κ B negative feedback loop that inhibits apoptosis in breast cancer cells. Cancer Res 2015; 75(8): 1703-13.
 - 26- Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. Cancer Res 2009; 69(4): 1279-83.
 - 27- Xiao B, Zhu ED, Li N, Lu DS, Li W, Li BS, *et al.* Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. Oncol Rep 2012; 27(2): 559-66.
 - 28- Zhong H, Wang HR, Yang S, Zhong JH, Wang T, Wang C, *et al.* Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF- β pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. Int J Hematol 2010; 92(1): 129-35.

Original Article

miR-146a: A possible tumor suppressor in multiple myeloma

Kazemzadeh S.¹, Farsinejad A.², Sabour Takanlu J.¹, Kaviani S.¹, Atashi A.³,
Soleimani M.¹, Abroun S.¹

¹Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

Abstract

Background and Objectives

MicroRNAs play a crucial role in controlling the innate and adaptive immune responses, inflammation, cell growth, and apoptosis by regulating gene expression at post-transcriptional level. In addition, many microRNAs act as oncogenes, tumor suppressors, and the mediators of cancer stem cells. MiR-146a is one of the important microRNAs in inflammatory diseases and tumors which has a dual effect on cancers and acts as a tumor promoter or a tumor suppressor. The present study aimed to evaluate the expression of miR-146a in multiple myeloma cell lines (L363, LP1, RPMI 8226 and KMM1) in comparison with normal leukocytes.

Materials and Methods

In this experimental study, four myeloma cell lines and peripheral blood leukocytes isolated from healthy individuals were cultured under specific conditions. After RNA extraction, miR-146a expression was measured by quantitative Real Time PCR.

Results

The research results showed that the expression of miR-146a in multiple myeloma cell lines was significantly decreased compared with normal leukocytes. Data analysis also revealed that the expression of miR-146a was decreased in average of 0.32 ± 0.2 folds in L363 cell line and for LP1, RPMI 8226, and KMM1 cell lines in average of 0.03 ± 0.07 , 0.0035 ± 0.02 , 0.0022 ± 0.001 folds, respectively ($p < 0.01$).

Conclusions

The researchers' results suggest that miR-146a can act as a tumor suppressor in leukocytes, and the decreased expression of this microRNA in myeloma cells is likely to be effective at the onset and progression of multiple myeloma.

Key words: Multiple Myeloma, MicroRNAs, miR-146a human

Received: 4 Jan 2016

Accepted: 1 Jun 2016

Correspondence: Kaviani S., PhD of Hematology. Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.

P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883832; Fax: (+9821) 82884507.

E-mail: kavianis@modares.ac.ir