

بیان LncRNA HOX transcript antisense RNA در بیماران تازه تشخیصی داده شده لوسمی لنفوبلاستیک حاد

پرویز فلاح^۱، مجتبی ملایی^۲، علی احسان حیدری^۳، مسعود سلیمانی^۴، مهدی جاهدی زرگر^۵، احسان عارفیان^۶،
طاهره مدنی^۷، موژان اسدی^۸، بهزاد پوپک^۹

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی حاد لنفوبلاستی، شایع ترین بدخیمی دوران کودکی می باشد. سالانه در کل دنیا به ازای هر ۱۰۰ هزار نفر، ۱ تا ۴/۷ نفر به این بیماری مبتلا می شوند. Long non-coding RNA ها (lncRNAs)، گروهی از RNA های غیرکدشونده هستند که در فرآیندهای زیستی از جمله تغییرات اپی ژنتیکی، کنترل رونویسی و ترجمه نقش دارند. استفاده از lncRNA های اختصاصی خونی و شناسایی عملکرد آنها می تواند در شناخت بیشتر پاتوفیزیولوژی این بیماری و به دنبال آن در درمان کمک کننده باشد. از جمله lncRNA های مهم در روند خونسازی، LncRNA HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) می باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان بیان آن در بیماران تازه تشخیص داده شده لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده سلولی B (B-ALL) بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه توصیفی - مقطعی، میزان بیان HOTAIR در نمونه مغز استخوان ۴۰ بیمار تازه تشخیص داده شده B-ALL و هم چنین در ۱۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل با روش Real Time PCR سنجیده شد. یافته ها توسط برنامه REST 2009، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

میزان بیان HOTAIR در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل به طور معناداری ۱۲۱ برابر افزایش داشت ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه گیری

میزان بیان افزایشی HOTAIR در لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B می تواند پیشگوکننده این باشد که افزایش بیان آن با پاتوفیزیولوژی این بیماری در ارتباط می باشد. اگر چه به مطالعه های بیشتری جهت بررسی میزان بیان آن در لوسمی های دیگر و مشخص کردن نقش آن نیاز می باشد.

کلمات کلیدی: خونسازی، LncRNA، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۴

۱- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران

۲- کارشناس علوم آزمایشگاهی - مرکز تحقیقات بنیاد - تهران - ایران

۳- PhD انگل شناسی پزشکی - دانشیار دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران

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

۵- دانشجوی دکترای تخصصی هماتولوژی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران

۶- PhD ویروس شناسی پزشکی - استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران - تهران - ایران

۷- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند - تهران - ایران

۸- فوق تخصص خون و آنکولوژی بالغین - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران

۹- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۹۵-۱۹۳۹۵

مقدمه

لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL)، در اثر تجمع لنفوبلاست‌ها در مغز استخوان ایجاد شده و شایع‌ترین بدخیمی دوران کودکی می‌باشد (۱). سالانه در کل دنیا به ازای هر ۱۰۰ هزار نفر، ۱ تا ۴/۷ نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند (۲). بیشترین میزان بروز ALL در سنین بین ۳ الی ۷ سالگی بوده، حدود ۷۵٪ موارد آن قبل از ۶ سالگی رخ می‌دهند. میزان شیوع بعدی ALL بعد از ۴۰ سالگی می‌باشد (۳). در ۸۵٪ از موارد رده سلولی گرفتار از نوع B (B-ALL) بوده و میزان بروز آن در هر دو جنس یکسان است. رده سلولی درگیر در ۱۵٪ بقیه از نوع T (T-ALL) می‌باشد.

RNAهای غیر کدشونده را می‌توان به دو دسته کلی ncRNAهای کوچک مانند میکروRNAها (miRNA) و ncRNAهای بلند (lncRNA) تقسیم‌بندی کرد (۴). محتوای رونویسی پستانداران شامل تعداد بسیار زیادی رونوشت به نام RNA غیر کدشونده بلند (lncRNA) می‌باشد که این RNAها طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند و پروتئینی از این گروه از RNAها ترجمه نمی‌شود (۵). این گروه در پروسه‌های زیستی بسیاری نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند از این جمله می‌توان به نقش lncRNAها در ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیکی، به هم پیوستن mRNA، کنترل ترجمه و کنترل رونویسی اشاره کرد (۶-۹). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تغییر و یا نقص در بیان این lncRNA با پیش‌آگهی، متاستاز و ایجاد بدخیمی‌ها در ارتباط است، به طور مثال افزایش بیان در lncRNA که نقش پروتو-انکوژن در سلول‌های طبیعی ایفا می‌کنند، سبب افزایش رشد تومور و ماتریکس آن، افزایش متاستاز و افزایش تکثیر سلول‌های بدخیم می‌شوند (۱۰-۱۲). در انواع زیر گروه‌های لوسمی لنفوئیدی حاد، پاتوژن دقیق بیماری کامل مشخص نشده است (۱۳). شناسایی عملکرد و نقش Long non-coding RNAهای اختصاصی خونی در پاتوفیزیولوژی لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌تواند در ارائه راه‌کارهای درمانی این بیماری کمک‌کننده باشد. با توجه به بررسی مقاله‌های متعدد از جمله lncRNAهای تنظیمی مهم در سیستم خونساز، HOTAIR می‌باشد. HOTAIR اولین بار توسط

رین و همکارانش به عنوان یک RNA پلی‌آدنیل که ۲۱۵۸ نوکلئوتید و ۶ اگزون دارد معرفی شد (۱۴). در واقع HOTAIR نقش مهمی در تکثیر، آپوپتوز، مهاجم، متاستاز و حرکت سلول‌های بدخیم دارد (۱۰). هدف از انجام این مطالعه با توجه به نقش‌های مهم و تعداد ژن‌های هدف زیاد HOTAIR در روند خونسازی، بررسی میزان بیان آن در بیماران ALL بود که می‌تواند در تعیین نقش آن در پاتوژن و به دنبال آن در درمان این بیماری کمک‌کننده باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بیماران و افراد سالم:

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، از ۴۰ بیمار تازه تشخیص داده شده B-ALL و هم چنین از ۱۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل، یک میلی لیتر مغز استخوان همراه با ضد انعقاد K2-EDTA از آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. کل بیماران ۱۷ زن و ۲۳ مرد بودند که میانگین سنی آن‌ها ۴ سال و تشخیص آن‌ها Common B ALL بود. گروه کنترل هم از کودکان سالم انتخاب شد. معیارهای انتخاب بیماران بر اساس یافته‌های مورفولوژیکی خون شناسی خاص لوسمی لنفوبلاستیک حاد (از جمله افزایش تعداد گلبول‌های سفید، افزایش رده لنفوئیدی مانند لنفوبلاست خون محیطی)، آزمایش‌های مولکولی [از جمله t(12;21)] و ایمونوفنوتایپینگ به روش فلوسایتومتری (بررسی CD مارکرهای رده لنفوئیدی) بود. تمامی بیماران تازه تشخیص داده شده بودند و هیچ گونه دارویی مصرف نکرده بودند. معیار انتخاب افراد کنترل هم نداشتن هیچ گونه بیماری از جمله بدخیمی‌های خونی و دیگر بدخیمی‌ها بود. کلیه نمونه‌ها با گرفتن رضایت‌نامه به منظور انجام کارهای تحقیقاتی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های مغز استخوان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و از هر یک از نمونه‌ها (بیماران و کنترل) RNA استخراج گردید.

استخراج RNA:

مراحل کار به شرح زیر می‌باشد:

یک میلی لیتر RNX-Plus سرد به ۵۰۰ میکرولیتر نمونه مغز استخوان اضافه و خوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون وارد یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری گردید و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. بعد از ورتکس، این مخلوط ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (به منظور جداسازی اجزای سلولی برحسب چگالی) به محتویات میکروتیوب اضافه کرده و یک دقیقه به شدت تکان داده شد. سپس ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm انجام شد. جداسازی محلول رویی (فاز آبی) و انتقال آن به میکروتیوب جدید صورت گرفت. هم حجم فاز آبی (محلول رویی) به آن اتانول ۱۰۰٪ سرد (به منظور آبگیری) اضافه گردید. سپس به آرامی مخلوط کرده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دور ریختن محلول رویی (رسوب سفیدرنگی دیده می شود) انجام شد. یک میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه و ورتکس شد تا رسوب از ته لوله کنده شود. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm صورت گرفت. محلول رویی دور ریخته شد و درب لوله ۱۰ دقیقه باز ماند تا RNA رسوب کرده خشک شود. حدود ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب RNase-DNase free اضافه شد و در ادامه کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با روش فتومتری تعیین گردید. نهایتاً محلول حاصل، جهت نگهداری به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

ساخت cDNA:

مراحل ساخت cDNA به شرح زیر انجام شد:

یک میکروگرم از RNA تخلیص شده در لوله ۲۰۰ میکرولیتر جداگانه، با ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر ۱۰ پیکومول Random Hexamer مخلوط و حجم تیوب با آب RNase-free DNase به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. درب لوله ها را بسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در ترموسایکلر گذاشته شد. سپس لوله ها فوراً بر روی یخ قرار گرفت و به هر کدام از آن ها، ۴ میکرولیتر بافر ۵ X (فرمتاز)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ mm) و ۱

میکرولیتر ترانس کریپتاز معکوس (فرمتاز) افزوده شد. سپس درب لوله را بسته و طبق دستورالعمل دمایی در ترموسایکلر گذاشته شد. دستورالعمل دمایی به این صورت بود: دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه، دمای ۴۲ درجه سانتی گراد ۴۵ دقیقه و در نهایت ۷۵ درجه سانتی گراد (برای غیر فعال کردن آنزیم) ۱۰ دقیقه.

واکنش Real-Time PCR برای بررسی میزان بیان HOTAIR

سنجش میزان بیان HOTAIR به روش Real Time PCR (دستگاه ABI) صورت گرفت. در این مرحله جهت بررسی میزان بیان HOTAIR در نمونه های Common B-ALL و نمونه های کنترل، نیاز به آغازگرهای جلوبرنده و معکوس برای ژن HOTAIR است. از ژن B2M به عنوان کنترل داخلی برای طبیعی کردن نتایج استفاده شد.

جدول ۱: اجزای لازم برای واکنش Real-time PCR در دستگاه ABI

غلظت (μM)	اجزای تشکیل دهنده
۱ μL × (۱۲/۵)	Master Mix (SYBR [®] Premix Ex Taq [™] - Takara)
۰/۵	Forward Primer (10pmol)
۰/۵	Reverse Primer (10pmol)
۲ μL	Template (cDNA)
تا حجم ۲۵ μL	diH ₂ O

جدول ۲: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-time PCR برای ها LncRNA

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	چرخه
فعال سازی آنزیم	۹۵	۳۰	۱
دناچوراسیون	۹۵	۵	۴۵
آنیلینگ و اکستنشن	۶۰	۳۰	
افزایش دما از ۵۰ درجه سانتی گراد تا Melt برای رسم منحنی ۹۰ درجه سانتی گراد			

جدول ۳: توالی آغازگرهای طراحی شده برای ردیابی *HOTAIR* و β_2M

نام ژن	آغازگر	طول محصول (bp)
<i>HOTAIR</i>	F: GAAAGCTTCCACAGTGAGGACT R: AAATCCGTTCCATTCCACTG	۱۲۳
β_2M	F: ATGCCTGCCGTGTGAAC R: ATCTTCAAACCTCCATGATG	۹۱

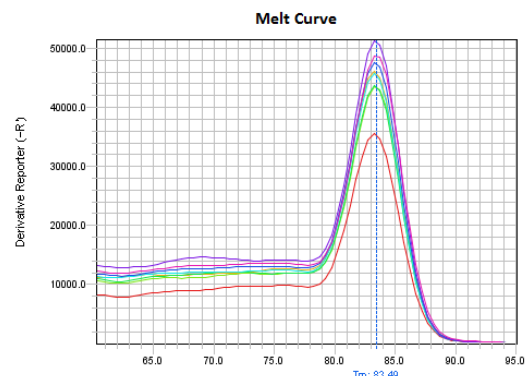
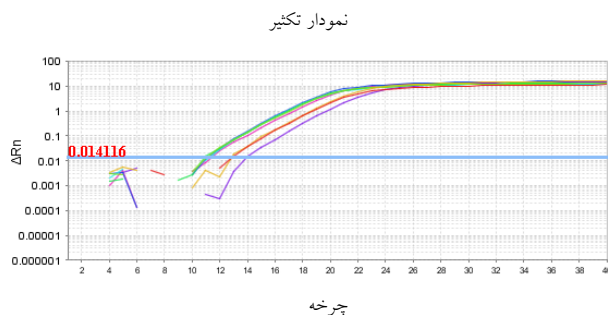
روش‌های آماری: میزان بیان *HOTAIR* و β_2M (کنترل داخلی) در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به B-ALL و افراد سالم به دست آمد و نتایج در برنامه REST ۲۰۰۹ (Relative Expression Software Tool) (کیاژن، آلمان) به صورت سنجش نسبی با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با راندمان (efficiency) یک، تجزیه و تحلیل شد (جدول ۳).

یافته‌ها

نتیجه Real-Time PCR:

با آنالیز و مقایسه نتایج Real-Time PCR، بیان سطح *HOTAIR* در بیماران نسبت به افراد سالم مشخص شد. میزان بیان آن به طور معناداری ۱۲۱ برابر بیشتر بود (نمودارهای ۱ و ۲) ($p < 0.05$).

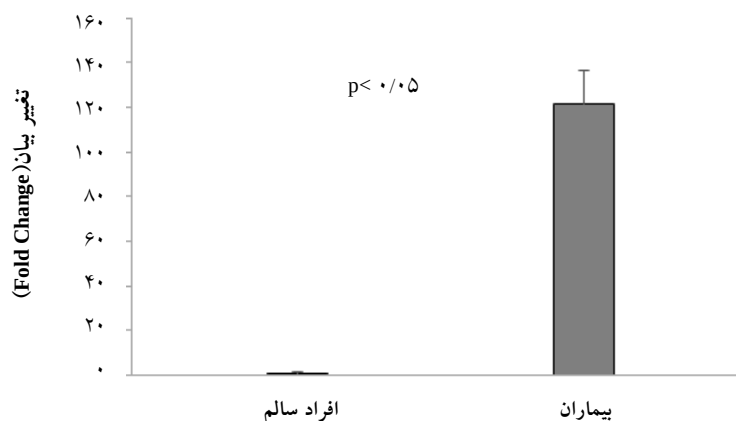
نمونه کنترل منفی با عنوان NTC (No template Control) نیز که شامل تمامی مواد به غیر از cDNA می‌باشد، در هر سری کاری گذاشته شد. نمونه‌ها را به آرامی و بدون ورتکس مخلوط کرده و در دستگاه Real time PCR (ABI) PCR شد (جدول ۱ و ۲).



دما (درجه سانتی‌گراد)

نمودار ۱: نمودارهای ذوب و تکثیر *HOTAIR* به روش Real Time PCR

تغییرات سطح بیان *Hot Air* در بیماران نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲: بیان سطح mRNA ژن *HOTAIR* در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم ($p < 0.05$)

بحث

در مطالعه‌های مختلف، مشخص شده است که یکی از تنظیم‌گرهای مهم روند خونسازی در سطح mRNA، یک کلاس از RNAهای غیر کدکننده به نام LncRNA ها می‌باشند (۱۵). بنابراین بسیار حائز اهمیت است که مشخص گردد چطور LncRNA ها در تنظیم یا از تنظیم خارج شدن روند خونسازی نقش ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، هدف بررسی بیان سطح HOTAIR در بیماران تازه تشخیص داده شده لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B با روش Real-Time PCR بود که به این منظور میزان بیان HOTAIR در نمونه‌های مغز استخوان بیماران تازه تشخیص داده شده B-ALL و افراد سالم به عنوان گروه کنترل سنجیده شد. نتایج نشان داد که میزان بیان در بیماران نسبت به افراد سالم افزایش معناداری دارد ($p \leq 0.05$). HOTAIR یک LncRNA می‌باشد که نقش یک انکوژن را در سرطان‌های مختلف از جمله سینه، معده، روده و رحم دارد (۱۸-۱۶). می‌توان نقش آن را در این لوسمی به عنوان انکوژن به طور بالقوه در نظر داشت. از طرفی مطالعه‌های گسترده‌ای نقش کلیدی HOTAIR را به عنوان عامل شروع‌کننده و پیشرفت‌دهنده در سرطان‌های مختلف نشان داده‌اند (۱۹).

با توجه به این که مطالعه حاضر در بیماران تازه تشخیص داده شده انجام شد، می‌توان آن را یکی از عوامل بالقوه شروع‌کننده این لوسمی دانست. در مطالعه ژانگ که تغییرات بیان HOTAIR در برخی از لوسمی‌های حاد بررسی شده است، بیان HOTAIR در بیماران لوسمی منوبلاستیک حاد افزایش معناداری داشته و نشان داده شد در مقایسه با افرادی که میزان بیان HOTAIR کمتری داشتند، میزان بقا کمتر است (۲۰).

در مطالعه هائو مشخص شده که میزان بیان HOTAIR در لوسمی میلوبلاستیک حاد افزایش دارد و نشان‌دهنده پیش‌آگهی ضعیف در بیماران می‌باشد (۲۱). در واقع یک trans-acting LncRNA است که با Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) برهمکنش دارد و نقش مهمی در اشغال جایگاه آن به طور فیزیکی ایفا می‌کند (۲۲). PRC2 یک هیستون متیل ترانسفراز است که خاموش‌سازی

اپی‌ژنتیکی بسیاری از ژن‌ها را در مسیرهای مختلف از جمله در به وجود آمدن بدخیمی یا سرطان کنترل می‌کند. این بدین معنی است که در حالت عادی، PRC2 بدون برهمکنش باعث جلوگیری از بدخیمی‌ها می‌شود، در حالی که وقتی HOTAIR با PRC2 برهمکنش برقرار می‌کند، مسیرهای منتهی به بدخیمی فعال می‌شوند و این گونه استنتاج می‌شود که افزایش بیان HOTAIR می‌تواند یکی از دلایل کمک‌کننده به ایجاد بدخیمی ALL باشد (۲۳). در مطالعه لوون و همکاران مشخص شد که میزان بیان HOTAIR در بیماران مبتلا به سرطان ریه افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل دارد و از طرفی سطح افزایش آن نیز با متاستاز و پیش‌آگهی فقیر همراه می‌باشد (۲۴).

وو و همکاران میزان افزایش یافته بیان ژن HOTAIR را در سلول‌های کارسینومایی کلیه گزارش کردند (۲۵). در مطالعه یان و همکاران مشخص شد که بیان ژن HOTAIR در نمونه‌های بافتی سرطان مثانه افزایش دارد (۲۶). تغییرات میزان بیان HOTAIR در این بیماری به طور بالقوه نشان‌دهنده نقش آن در پاتوژنز بیماری می‌باشد بنابراین می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در نظر گرفته شود.

HOTAIR در آینده می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی جهت بهبود روش‌های درمانی موجود برای بدخیمی‌های خونی از جمله لوسمی لنفوبلاستیک حاد قرار گیرد. اگر چه برای رسیدن به اهداف درمانی نیاز به مشخص شدن دقیق مسیرهای مولکولی تغییردهنده بیان این ژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که میزان بیان HOTAIR در لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B بیان افزایشی دارد و می‌تواند پیشگوکننده این باشد که افزایش بیان آن با پاتوفیزیولوژی این بیماری در ارتباط می‌باشد. هم چنین به مطالعه‌های بیشتری نیاز است تا با بررسی LncRNA های مهم دیگر و مشخص کردن ژن‌های هدف آن‌ها، بتوان نقش دقیق آن‌ها را در پاتوژنز این بیماری و ارتباط بیان آن‌ها با میزان بقای بیماران تعیین کرد و در ادامه از آن‌ها در درمان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و با مساعدت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی البرز در مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته با کد اخلاق ۱۳۹۴/۱۰۲ انجام شده

است که بدین وسیله از آن‌ها قدردانی می‌شود. هم‌چنین از آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند به خاطر کمک در جمع‌آوری نمونه‌ها تشکر می‌شود.

References:

- Tomizawa D, Kiyokawa N. Acute Lymphoblastic Leukemia: Hematological Disorders in Children. USA: Springer; 2017. p. 33-60.
- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013; 381(9881): 1943-55.
- Kahn JM, Keegan TH, Tao L, Abrahão R, Bleyer A, Viny AD. Racial disparities in the survival of American children, adolescents, and young adults with acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, and Hodgkin lymphoma. Cancer 2016; 122(17): 2723-30.
- Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. Nat Rev Genet 2014; 15(1): 7-21.
- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 2011; 12(12): 861.
- Boon RA, Jaé N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? J Am Coll Cardiol 2016; 67(10): 1214-26.
- Sigova AA, Mullen AC, Molinie B, Gupta S, Orlando DA, Guenther MG, et al. Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 2013; 110(8): 2876-81.
- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. Cell 2011; 147(2): 358-69.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet 2009; 10(3): 155.
- Wu Y, Zhang L, Zhang L, Wang Y, Li H, Ren X, et al. Long non-coding RNA *HOTAIR* promotes tumor cell invasion and metastasis by recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2015; 46(6): 2586-94.
- Huang L, Liao LM, Liu AW, Wu JB, Cheng XL, Lin JX, et al. Overexpression of long noncoding RNA *HOTAIR* predicts a poor prognosis in patients with cervical cancer. Arch Gynecol Obstet 2014; 290(4): 717-23.
- Svoboda M, Slysokova J, Schneiderova M, Makovicky P, Bielík L, Levy M, et al. *HOTAIR* long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. Carcinogenesis 2014; 35(7): 1510-5.
- Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. N Engl J Med 2015; 373(16): 1541-52.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. Cell 2007; 129(7): 1311-23.
- Swain A, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, Sugiyama D. Intrinsic and extrinsic regulation of mammalian hematopoiesis in the fetal liver. Histol Histopathol 2014; 29(9): 1077-82.
- Liu XH, Sun M, Nie FQ, Ge YB, Zhang EB, Yin DD, et al. LncRNA *HOTAIR* functions as a competing endogenous RNA to regulate HER² expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. Mol Cancer 2014; 13(1): 92.
- Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, et al. *HOTAIR* is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. Oncogene 2013; 32(13): 1616-25.
- Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, Abe J, Tamai K, Tanaka N, et al. Large noncoding RNA *HOTAIR* enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. Biochem Biophys Res Commun 2013; 436(2): 319-24.
- Qiu JJ, Lin YY, Ye LC, Ding JX, Feng WW, Jin HY, et al. Overexpression of long non-coding RNA *HOTAIR* predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2014; 134(1): 121-8.
- Zhang YY, Huang SH, Zhou HR, Chen CJ, Tian LH, Shen JZ. Role of *HOTAIR* in the diagnosis and prognosis of acute leukemia. Oncol Rep 2016; 36(6): 3113-22.
- Hao S, Shao Z. *HOTAIR* is upregulated in acute myeloid leukemia and that indicates a poor prognosis. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(6): 7223-8.
- Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. Cell 2011; 145(2): 178-81.
- Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, et al. Long noncoding RNA *HOTAIR* regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. Cancer Res 2011; 71(20): 6320-6.
- Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, Shan B. Functions of lncRNA *HOTAIR* in lung cancer. J Hematol Oncol 2014; 7: 90.

- 25- Wu B, Ma H, Qu W, Wang B, Zhang X, Wang P, *et al.* Catalytic infrared and hot air dehydration of carrot slices. J Food Process Eng 2014; 37(2): 111-21.
- 26- Yan TH, Lu SW, Huang YQ, Que GB, Chen JH, Chen YP, *et al.* Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer. Tumour Biol 2014; 35(10): 10249-57.

Original Article

HOTAIR expression in newly diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia patients

**Fallah P.¹, Molaie M.², Ehsan Heidari A.³, Soleimani M.⁴, Jahedi Zargar M.¹,
Arefian E.⁵, Madani T.⁶, Asadi M.³, Poopak B.⁷**

¹Allied-Health Faculty, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

²Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

³Faculty of Medical Sciences, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁴Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁵Biology School of Tehran University, Tehran, Iran

⁶Peyvand Clinical & Specialty Laboratory, Tehran, Iran

⁷Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. The prevalence of ALL is 1 to 4/7 per 100,000 population every year world-wide. Long non-coding RNAs (LncRNAs) are a group of non-coding RNAs involved in many biological processes, such as epigenetic changes, regulation of mRNA transcription and translation. Identification of their function can be helpful to understand the pathophysiology and treatment of ALL. One of the important LncRNAs in hematopoiesis regulation is *HOTAIR* (LncRNA HOX transcript antisense RNA). The purpose of this study was to determine the expression of *HOTAIR* LncRNA in newly diagnosed B-ALL patients.

Materials and Methods

In this cross-sectional descriptive study, 40 newly diagnosed B-ALL patients as well as 15 healthy individuals as control were given 1mL of bone marrow specimen with EDTA anticoagulant. RNA (patients and control) was extracted and Real-time quantitative PCR was used to examine the expression of LncRNA *HOTAIR* in ALL patients. The results was analyzed by REST 2009.

Results

The findings showed that expression of *HOTAIR* in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia type B increased significantly as compared to healthy controls ($p < 0.05$).

Conclusions

In conclusion, the increase expression of *HOTAIR* in acute lymphoblastic leukemia can be attributed to potential role of LncRNA *HOTAIR* in pathophysiology of the disease.

Key words: Hematopoiesis, LncRNAs, Lymphocytic Leukemia, Acute

Received: 22 Aug 2017

Accepted: 13 Feb 2018

Correspondence: Poopak B., PhD of Hematology and Blood Banking, Assistant Professor of Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch.

P.O.Box: 19395-1495, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22264144; Fax: (+9821) 22264144

E-mail: bpopak@gmail.com