خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۳ پاییز ۹۴ (۲۳۲-۲۲۳)

مقاله پژوهشی

بررسی بیان miR-150 و miR-155 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن

پرویز فلاح[۱]، حسین تیموری نقده[۲]، مسعود سلیمانی[۳]، ناصر امیری‌زاده[۴]، بهزاد پوپک[۵]، غلامرضا توگه[۶]، احسان عارفیان[۷]، شیرین بلوری[۸]، طلوع گلکار[۹]، زینب پیر محمد جماعت[۱۰]

چکیده

سابقه و هدف

میکرو RNAها، نوعی از RNAهای کوچک غیر کدکننده هستند و اخیراً مشخص شده که نقشی اساسی در فرآیندهای مهم سلولی از جمله تکامل و تمایز از طریق تنظیم پس از رونویسی، ایفا می‌کنند. میزان بیان میکرو RNAها در ارتباط با بیماری‌زایی بعضی بدخیمی‌های خونی از جمله لوسمی میلوئیدی حاد شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی بیان miR-150 و miR-155 در بیماری لوسمی میلوژنوس مزمن(CML) بود تا با شناسایی تغییرات این میکرو RNAها بتوان از آن‌ها در تشخیص، درمان و تخمین حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD) استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، بیان miR-150 و miR-155 در ۲۵ بیمار CML در فاز مزمن و ۲۵ فرد سالم که به آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند مراجعه کرده بودند، با روش‌های Stem-loop RT-PCR و Real Time PCR سنجیده شد. یافته‌ها توسط آزمون آماری پیرسون، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

miR-150 و miR-155 در بیماران CML نسبت به افراد سالم کاهش بیان داشت(به ترتیب ۰/۵۱۲ و ۰/۲۵۵۲). آنالیز آماری پیرسون ارتباطی بین یافته‌های آزمایشگاهی و بیان این دو miR نشان نداد. اما miR-155 با سن بیماران ارتباط معکوس داشت($p\leq ۰/۰۱$).

نتیجه گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، کاهش بیان miR-150 و miR-155 در CML می‌تواند پیشگوکننده این باشد که با القای افزایش بیان این دو میکرو RNA ها، می‌توان از تکثیر زیاد سلول‌ها در این بیماری کاست. هم چنین به مطالعه‌های دیگری نیاز است تا با شناخت ژن‌های هدف این میکرو RNA ها، به نقش دقیق آن‌ها در این بیماری پی برد.

کلمات کلیدی: **میکرو RNA ها، miR-150 انسانی، miR-155 انسانی، لوسمی میلوژنوس مزمن**

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳

۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران و مربی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز ـ کرج ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- مؤلف مسئول : PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۴- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی ـ واحد پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۶- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۷- PhD ویروس‌شناسی پزشکی ـ استادیار دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران ـ تهران ـ ایران
۸- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند ـ تهران ـ ایران
۹- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند ـ تهران ـ ایران
۱۰- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

مقدمه

لوسمی میلوژنوس مزمن(CML)، یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد، که جزو اختلالات میلوپرولیفراتیو تقسیم‌بندی می‌شود و حدود ۱۵٪ لوسمی بزرگسالان را به خود اختصاص داده است. وقوع این بیماری سالانه ۱ تا ۲ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. سن درگیری بیماران ۴۵ تا ۵۵ سال است، اما این بیماری در تمام گروه‌های سنی حتی کودکان هم دیده می‌شود(۲، ۱). میکرو RNA ها توالی‌های RNA کوچک ۱۸ تا ۲۲ نوکلئوتید تک رشته‌ای هستند و نشان داده شده است که نقشی اساسی در تنظیم بیان ژن از طریق مهار mRNAهای هدف، ایفا می‌کنند(۳). میکرو RNA ها بر اساس ژن‌های هدف خاص، پروسه‌های سلولی مختلفی از جمله تکثیر، انتقال سیگنال، آپوپتوز و تومورژنزیس را تنظیم می‌کنند(۴). همین طور میکرو RNA ها تنظیم کننده‌های مهم رونویسی در خونسازی هستند(۵). نقش میکرو RNA ها در ایجاد سرطان در انسان شناخته شده و از جهتی توانایی بالقوه این RNAهای کوچک غیر کدکننده در درمان و تشخیص سرطان توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است(۶).میکرو RNA ها می‌توانند با مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد سرطان نقش داشته باشند. یکی از این مکانیسم‌ها وجود جهش در ژن میکرو RNAها می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری و تحقیقات آزمایشگاهی نشانگر بیان بیش از ۱۰۰۰ نوع میکرو RNA در انسان می‌باشد، که بیش از ۵۰٪ از این میکرو RNA ها در جایگاهی از ژنوم واقع شده‌اند که از نظر ژنتیکی ناحیه حساس به جهش شناخته شده و در بسیاری از سرطان‌ها، ناهنجاری‌های ژنتیکی در این ناحیه مشاهده می‌شود. بسیاری از ژن‌های مهارکننده سرطان و آنکوژن‌ها، تحت کنترل دقیق میکرو RNA ها می‌باشند(۷). بنابراین هر گونه تغییر در بیان میکرو RNA های تارگت‌کننده این ژن‌ها می‌تواند باعث اختلالات تنظیمی در بیان ژن‌ها شده و نهایتاً منجر به سرطان شود که با استفاده از این ویژگی می‌توان از میکرو RNA ها در تشخیص، پیشگیری و حتی اندازه‌گیری حداقل بیماری باقی‌مانده(MRD) استفاده نمود(۸). در سال‌های اخیر با افزایش پیشرفت در زمینه روش‌های مولکولی و مطالعه‌های انجام شده بر روی میکرو RNA ها، نقش این عناصر تنظیمی اپی‌ژنتیک در تمایز سلول‌های خونساز مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد که میکرو RNA ها سهم قابل توجهی در طول این فرآیند سلولی دارند(۹). میزان بیان میکرو RNA ها در ارتباط با پاتوژنز بعضی بدخیمی‌های خونی شناخته شده است(۱۰). هم چنین بیان نامعمول (غیر عادی) میکرو RNA ها در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله لوسمی میلوئیدی حاد توصیف شده است(۱۱). نقش میکرو RNA ها در ایجاد سرطان در انسان و از جهتی توانایی بالقوه این RNA های کوچک غیر کدکننده در درمان و تشخیص سرطان توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است(۱۲). بنابراین نقش میکرو RNA ها و بیان ژن‌ها امروزه به طور گسترده‌ای در بدخیمی‌های انسان مطالعه شده و ترکیبات شیمیایی که سطح میکرو RNA ها را تغییر می‌دهند، به طور بالقوه می‌توانند استراتژی‌های تشخیصی و درمانی جدیدی برای CML باشند. لذا هدف از این مطالعه، بررسی بیان miR-150 و miR-155 دخیل در لوسمی میلوژنوس مزمن بود تا با شناسایی تغییرات این میکرو RNA ها بتوان از آن‌ها در تشخیص، درمان و تخمین حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD = Minimal Residual Disease) استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بیماران و افراد سالم:

در این مطالعه تجربی، از ۲۵ بیمار تازه تشخیص داده شده CML در فاز مزمن و هم چنین از ۲۵ فرد سالم به عنوان کنترل، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی همراه با ضد انعقاد EDTA از آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند جمع‌آوری شد. قابل ذکر است که حجم نمونه بر اساس مطالعه‌های قبلی انتخاب شده است(۱۳). معیارهای انتخاب بیماران بر اساس یافته‌های مورفولوژیکی خون‌شناسی خاص لوسمی میلوئیدی مزمن (از جمله افزایش تعداد گلبول‌های سفید، افزایش رده میلوئیدی مانند پرومیلوسیت و نوتروفیل در خون محیطی) و هم چنین آزمایش مثبت PCR برای ترانسلوکاسیون (9;22)(BCR-ABL1) (210 kD) بود. تمامی بیماران در فاز مزمن بودند و هیچ

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

گونه دارویی مصرف نکرده بودند. خون کامل در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و لایه بافی‌کوت جدا شد و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ادامه کار نگهداری شدند.

پیش‌بینی miRNA های با اهمیت در CML:

برای پیشگویی miRNA هایی که ژن‌های کلیدی را در مسیر سیگنالینگ این بیماری هدف قرار می‌دهند، از نرم‌افزارها و برنامه‌های زیر استفاده شد:

نرم‌افزار Pictar (http://pictar.mdc-berlin.de/)

نرم‌افزار MicroCosm (http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/ targets/v5)

نرم‌افزار Target Scan (Target Scan release ۵/۲ http://www.targetscan.org/)

نرم‌افزار miRWalk (http://www. umm. uni-heidelberg. de/ apps/ zmf/ miRwalk)

نرم‌افزار miRanda (http://www.microrna.org)

نرم‌افزار Diana-microT و هم چنین از سایت KEGG (http://www.genome.jp/kegg/) که مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی در بیماری‌های مختلف را نشان می‌دهد و سایت DAVID (http:// david. abcc. ncifcrf.gov/) استفاده شد. طی بررسی مقاله‌های متعدد، با توجه به نقش‌های مهم و تعداد ژن‌های هدف زیاد miR-150 و miR -155 در لوسمی میلوژنوس مزمن، این دو میکرو RNA برای این مطالعه انتخاب شدند(۱۶-۱۳).

طراحی آغازگر:

miRNA ها توالی‌های کوتاه ۲۵-۲۲ نوکلئوتیدی هستند که ردیابی آن‌ها با آغازگرهای معمول امکان پذیر نمی‌باشد. برای ردیابی آن‌ها از ساختاری به نام ساقه- حلقه -(stem-loop) استفاده شد. ساختار اولیه ساقه- حلقه از مقاله‌ای که در سال ۲۰۰۵ چاپ شده بود گرفته شد(۱۷). طول این توالی در بخش حلقه با اضافه نمودن چند نوکلئوتید طولانی‌تر شد. هم چنین ساختار نوکلئوتیدی با تغییر تعدادی از بازها طوری تغییر کرد که بدون به هم خوردن ساختار حلقه یا ساقه، دمای جدا شدن نیمی از دو رشته‌ها (Melting temperature) از ۱۰۲ درجه سانتی‌گراد به حدود ۸۵ درجه سانتی‌گراد رسید. به انتهای ساختار ساقه- حلقه، ۶-۴ نوکلئوتید مکمل انتهای ′۳ هر miRNA اضافه شد تا امکان cDNA سازی اختصاصی‌تر را فراهم نماید. بنابراین برای هر miRNA یک ساختار حدود ۷۰ نوکلئوتیدی که شامل بخش ثابت ساقه- حلقه و انتهای ′۳ متغیر(مربوط به شناسایی miRNA) بود طراحی شد. برای طراحی‌ها از برنامه‌های AlleleID6، GeneRunner، Oligo6 و mfold (برای بررسی ساختارهای ثانویه) استفاده شد. آغازگر سنس برای هر miRNA مکمل توالی نوکلئوتیدی miRNA (با کنار گذاشتن نوکلئوتیدهایی که برای اضافه نمودن Tm در صورت نیاز به انتهای '5 آغازگر افزوده شد) طراحی شد. بر روی ساقه ساختار ساقه- حلقه نیز آغازگر آنتی‌سنس طراحی شد تا امکان ردیابی miRNA کوتاه را فراهم نماید(جدول۱).

جدول ۱:توالی آغازگرهای طراحی شده برای ردیابی miRNA ها

miRNA	سکانس	دما
>hsa-miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	
miR-15 RT stem-loop	GGTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATCCATCGCACGCATCGCACTGCATACGACCCACTGG	۹۴/۸ درجه سانتی‌گراد
miR-150 Forward Primer	ACATCTCCCAACCCTTGTAC	۶۰/۷ درجه سانتی‌گراد
>hsa-miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	
miR-155 RT stem-loop	GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACACCCCT	۹۴/۳ درجه سانتی‌گراد
miR-155 Forward Primer	CGGTTTAATGCTAATCGTGA	۶۱/۱ درجه سانتی‌گراد
Universal Reverse	GAGCAGGGTCCGAGGT	۵۹/۱ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

برای طبیعی کردن بیان miRNA ها از آغازگرهای اختصاصی ژن *SNORD 47* به عنوان housekeeping gene که طراحی آن هم به صورت ساختار ساقه- حلقه بود استفاده شد.

استخراج میکرو RNA:

مراحل کار به شرح زیر می‌باشد:

یک میلی‌لیتر RNX-Plus سرد به بافی‌کوت (لایه حاوی گلبول‌های سفید) اضافه شده و خوب مخلوط شد. سپس سوسپانسیون وارد یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ 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 و به صورت Overnight در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ دقیقه درrpm ۱۲۰۰۰و دور ریختن محلول رویی(رسوب سفید رنگی دیده می‌شود) انجام شد. یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه و ورتکس کرده تا رسوب از ته لوله کنده شود. سانتریفوژ ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ صورت گرفت. محلول رویی دور ریخته شد و درب لوله ۱۰ دقیقه باز ماند تا RNA رسوب کرده خشک شود. حدود۵۰-۳۰ میکرولیتر آب RNase-DNase free اضافه گردید و غلظت RNA استخراج شده تعیین شد. نهایتاً محلول حاصل، جهت نگهداری به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

ساخت cDNA:

مراحل ساخت cDNA به شرح زیر انجام شد:

یک میکروگرم از RNA تخلیص شده در دو لوله ۲۰۰ میکرولیتر جداگانه، با ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر ۱۰پیکومول Stem-Loop RT-primer مخلوط گردیده و حجم در هر تیوب با آب RNase-DNase free به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. درب لوله‌ها را بسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر گذاشته شد. سپس لوله‌ها فوراً بر روی یخ قرار گرفت و به هر کدام از آن‌ها، ۴ میکرولیتر بافر X ۵ (فرمنتاز)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰^{mm}) و ۱ میکرولیتر Reverse transcriptase (فرمنتاز) افزوده شد. سپس درب لوله را بسته و طبق دستورالعمل دمایی، در زیر ترموسایکلر گذاشته شد. دستورالعمل دمایی به این صورت بود: دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه، دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ دقیقه و در نهایت ۷۵ درجه سانتی‌گراد (برای غیر فعال کردن آنزیم) ۱۰ دقیقه.

جدول ۲ : اجزای لازم برای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotor Gene ۶۰۰۰

اجزای تشکیل‌دهنده	غلظت(µM)
Master Mix(SYBR^{R} Premix Ex Taq^{TM}- Takara)	۱ × (۱۲/۵) µL
Forward Primer (10pmol)	۰/۵
Universal Reverse Primer (10pmol)	۰/۵
Template (cDNA)	۲ µL
diH_2O	تا حجم ۲۵

جدول ۳: برنامه زمانی مراحل واکنش Real-Time qPCR برای miRNA ها

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

واکنش Real-Time PCR برای بررسی میزان بیان میکرو RNA ها:

پس از استخراج RNA و cDNA سازی با آغازگر RT حلقه- ساقه که برای هر miRNA با اضافه نمودن بخش انتهای توالی miRNA هدف اختصاصی شده بود، واکنش Real-Time PCR به صورت دو مرحله‌ای در دستگاه ۶۰۰۰ Rotor Gene (استرالیا، NSW ، Concorde ، Corbett) صورت گرفت. از ژن *SNORD ۴۷ (U۴۷)* به عنوان RNA ای با طول کوتاه به عنوان کنترل داخلی برای طبیعی کردن نتایج استفاده شد(جداول ۲ و ۳).

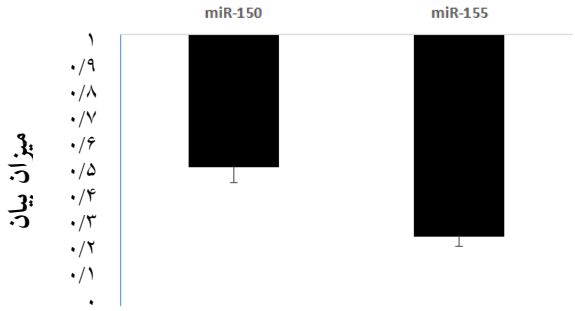
بیان miR-150 و miR-155 و SNORD47 در بیماران CML و نمونه‌های افراد سالم به دست آمده و نتایج در برنامه REST ۲۰۰۹ تجزیه و تحلیل شد. یافته‌های آزمایشگاهی وارد نرم‌افزار SPSS ۱۶ شد و با آزمون کای‌دو و پیرسون آنالیز آماری صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج Real-Time PCR :

نتایج Real-Time PCR ، بیان miR-150 و miR-155 در بیماران نسبت به افراد سالم پس از آنالیز در برنامه ۲۰۰۹ REST در جدول ۴ و شکل ۱ آورده شده است.

در مقایسه میزان بیان miR-150 و miR-155 در بیماران مبتلا به CML نسبت به گروه کنترل(افراد سالم) به ترتیب بیان آن‌ها ۰/۵۱۲ و ۰/۲۵۵۲ شد که هر دو کاهش بیان را نشان دادند. بیان این دو miRNA در بیماران نسبت به افراد سالم به طور معناداری کاهش داشت(p= ۰/۰۳). لازم به ذکر است که ژن SNORD به عنوان کنترل داخلی در کار استفاده شده است.



شکل ۱: بیان miR-150 و miR-155 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوژنوس مزمن در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم(p≤ ۰/۰۵)

یافته‌های آزمایشگاهی(بالینی):

در جدول ۵ یافته‌های آزمایشگاهی(بالینی) ۲۵ بیمار شامل سن، جنس، تعداد گلبول‌های سفید(WBC)، نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل نشان داده شده است.

ارتباط بین یافته‌های آزمایشگاهی و تغییرات بیان میکرو RNA ها :

ارتباط بین تغییرات بیان هر یک از میکرو RNA ها با جنس، سن، تعداد گلبول‌های سفید، تعداد مطلق نوتروفیل، لنفوسیت، منوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل (Pearson correlation) سنجیده شد. ارتباط معناداری بین آن‌ها وجود نداشت اما با افزایش سن بیماران، بیان miR-155 به طور معناداری کاهش بیشتری نشان داد که می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که با افزایش سن بیماران، بیان این میکرو RNA ها کاهش می‌یابد.(p= ۰/۰۰۲). در جدول ۶ ارتباط بین یافته‌های بالینی بیماران و تغییرات بیان میکرو RNA ها نشان داده شده است.

جدول ۴: نتایج Real-Time PCR بیان miR-150 و miR-155 در بیماران نسبت به افراد سالم(REF: Reference ، TRG:Target)

ژن	انواع	Reaction Efficiency	Expression	نتایج
SNORD	REF	۱/۰	۱/۰۰۰	
miR-150	TRG	۱/۰	۰/۵۱۲	DOWN
miR-155	TRG	۱/۰	۰/۲۵۵۲	DOWN

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

جدول ۵ : یافته‌های آزمایشگاهی بیماران

شماره بیمار	جنس	سن	گلبول سفید	نوتروفیل	لنفوسیت	منوسیت	ائوزینوفیل	بازوفیل
۱	۱	۵۷	۱۳۷/۸۱	۹۸/۵۳	۲۱/۲۲	۴/۶۹	۱/۵۲	۱۱/۸۵
۲	۱	۵۶	۱۹۳/۳۸	۱۶۳/۲۱	۱۱/۴۱	۸/۹	۵/۸	۴/۰۶
۳	۱	۴۹	۱۲۰/۹۳	۹۷/۴۸	۱۰/۲۸	۱۱	۰/۳۶	۱/۸۱
۴	۱	۵۶	۱۸۸/۸۴	۱۶۴/۵۴	۱۲/۴۴	۸/۱	۰/۵۷	۲/۸۳
۵	۰	۱۹	۲۲۱/۰۶	۱۹۶/۱۹	۱۱/۹۴	۵/۹۷	۳/۵۴	۴/۴۲
۶	۰	۴۳	۱۰۵/۳۸	۸۸/۸۳	۹/۲۷	۴/۸۵	۰/۵۳	۱/۹
۷	۱	۴۰	۱۱۳/۲۹	۹۱/۳۱	۱۲/۸	۴/۷۶	۱/۳۶	۳/۰۶
۸	۱	۲۶	۲۳۶/۸۵	۱۹۲/۵۶	۲۷/۲۴	۷/۱۱	۴/۳۶	۵/۶۸
۹	۱	۶۶	۱۵۱/۶۷	۱۳۵/۴۴	۶/۸۳	۸/۰۴	۰/۱۵	۱/۲۱
۱۰	۰	۲۷	۵۰/۴۷	۲۴/۴۷	۱۲/۵۲	۳/۴۸	۱/۷۲	۸/۲۸
۱۱	۱	۸۲	۱۳۸/۸۱	۸۶	۷/۱	۴/۴	۱	
۱۲	۰	۴۳	۱۶۶/۶۰	۹۰/۱	۴/۳	۳/۴	۰/۸	
۱۳	۱	۳۹	۱۳۸/۴۱	۱۱۴/۷۴	۱۴/۱۲	۵/۴	۳/۴۶	
۱۴	۱	۲۳	۲۸/۹۲	۱۹/۰۹	۵/۴۴	۲/۰۲	۱/۵۹	۰/۷۸
۱۵	۰	۶۸	۲۳/۱۰	۱۵/۵۷	۵/۴۵	۱/۲۲	۰/۲۸	۰/۵۸
۱۶	۱	۵۵	۱۲۰/۰۸	۷/۵۶	۸۷/۶۶	۲۴/۵	۰/۱۲	۰/۲۴
۱۷	۰	۳۵	۶۴/۹۰	۵۴/۱۸	۶/۴۳	۲/۸۶	۰/۳۲	۱/۱۷
۱۸	۱	۷۳	۷۱/۷۸	۵۵/۶۴	۹/۷۶	۳/۸	۱	۱/۵۸
۱۹	۱	۴۵	۲۵۴/۳۴	۱۳۱/۲۵	۵۱/۷۷	۵۳/۲۴	۵/۱۵	۳/۹۳
۲۰	۰	۶۳	۱۰۳/۴۹	۱۹/۸۷	۶۸/۵۱	۱۴/۹	۰	۰/۲۱
۲۱	۱	۴۶	۱۰۹/۵۸	۹۲/۱۶	۹/۵۳	۵/۰۴	۱/۲۱	۱/۶۴
۲۲	۰	۲۳	۱۱۰/۷۵	۸۱/۲۹	۱۵/۱۷	۲/۱	۱/۱۱	۱۱/۰۸
۲۳	۱	۳۱	۷۲/۷۹	۶۳/۳۳	۴/۹۵	۲/۹۱	۰/۴۴	۱/۱۶
۲۴	۱	۳۸	۱۰۲/۷۶	۸۴/۷۸	۱۰/۴۸	۵/۷۵	۰/۲۱	۱/۵۴
۲۵	۱	۷۶	۵۱/۰۲	۴۴/۳۸	۳/۹۳	۲/۳۵	۰/۲۶	۰/۱

جدول ۶: ارتباط بین یافته‌های بالینی بیماران و تغییرات بیان میکرو RNA ها

	جنس	گلبول سفید	نوتروفیل	لنفوسیت	منوسیت	ائوزینوفیل	بازوفیل
miR150	−۰/۱۱۹	۰/۱۷۷	−۰/۲۲۷	۰/۴۵۲	۰/۴۷۳	۰/۴۰۸	۰/۰۷۳
miR155	−۰/۲۲۲	−۰/۰۰۷	−۰/۱۴۵	۰/۳۲۱	۰/۲۵۸	۰/۲۰۴	۰/۰۱۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

بحث

لوسمی میلوژنوس مزمن(CML)، یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد، که جزو اختلالات میلوپرولیفراتیو تقسیم‌بندی می‌شود و حدود ۱۵٪ لوسمی بزرگسالان را به خود اختصاص داده است(۱۸). این لوسمی در ۹۵٪ موارد همراه با یک ناهنجاری کروموزومی به نام فیلادلفیا(Ph) می‌باشد که این ناهنجاری در نتیجه جابه‌جایی دو طرفه کروموزومی به دنبال شکست در باند q34 کروموزوم ۹ و شکست در باند q11 کروموزوم ۲۲ رخ می‌دهد(q34;q11) (9;22)t، در نتیجه کایمریسم BCR-ABL1 به وجود می‌آید. ژن *BCR-ABL1* به پروتئین KD ۲۱۰ ترجمه می‌شود که به عنوان $P\ ۲۱۰^{BCR-ABL1}$ شناخته می‌شود(۱۹).

در سال‌های اخیر شبکه جدیدی از چرخه‌های تنظیمی در سطح mRNA مورد توجه قرار گرفته است که شامل یک کلاس از RNAهای غیر کدکننده به نام میکرو RNA است.

میکرو RNA ها مولکول‌های RNA کوچک و تک رشته‌ای غیر کدکننده‌ای هستند که مکمل mRNA یک ژن کدکننده پروتئین دیگر می‌باشند و می‌توانند از بیان یک ژن و تولید پروتئین مربوطه جلوگیری کنند(۲۰). میکرو RNAها تنظیم‌کننده‌های مهم رونویسی در خونسازی هستند. میزان بیان آن‌ها در ارتباط با پاتوژنز بعضی بدخیمی‌های خونی شناخته شده است(۲۱، ۹). در سال‌های اخیر با افزایش پیشرفت در زمینه روش‌های مولکولی و مطالعه‌های انجام شده بر روی میکرو RNAها، نقش این عناصر تنظیمی اپی ژنتیک در تمایز سلول‌های خونساز مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد که میکرو RNAها سهم قابل توجهی در طول این فرآیند سلولی دارند(۱۳). بیان نامعمول(غیر عادی) میکرو RNAها در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله لوسمی لنفوئیدی مزمن توصیف شده است(۲۲). نقش میکرو RNA ها در ایجاد سرطان در انسان و از جهتی توانایی بالقوه این RNA های کوچک غیر کدکننده در تشخیص، درمان و کنترل حداقل بیماری باقی‌مانده آن توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است(۲۳). میکرو RNA ها می‌توانند با مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد سرطان نقش داشته باشند. یکی از مکانیسم‌های ایجاد سرطان به وسیله آن‌ها وجود جهش در ژن میکرو RNAها می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز کامپیوتری و تحقیقات آزمایشگاهی نشانگر بیان بیش از ۱۰۰۰ نوع میکرو RNA در انسان است، که بیش از ۵۰٪ از این میکرو RNA ها در جایگاهی از ژنوم واقع شده‌اند که از نظر ژنتیکی ناحیه حساس به جهش شناخته شده و در بسیاری از سرطان‌ها ناهنجاری‌های ژنتیکی در این ناحیه مشاهده می‌شود. به عنوان مثال، miR-15 و miR-16 از جمله میکرو RNA های موجود در نواحی جهش‌زا هستند که عملکرد آن‌ها به عنوان مهارکننده سرطان به اثبات رسیده است، به طوری که جهش ژنتیکی این میکرو RNA ها اولین بار در بیماران مبتلا به B-CLL نشان داده شده و در ادامه، این جهش در ۶۵٪ بیماران مبتلا به CLL ، در ۵۰٪ mantle cell lymphomas ، ۱۵ تا ۴۰ درصد multiple myelomas و ۶۰٪ سرطان پروستات گزارش شده است(۲۴). اختلال در میزان بیان، یکی دیگر از مکانیسم‌های ایجاد سرطان به وسیله میکرو RNA ها است. بسیاری از ژن‌های مهارکننده سرطان و انکوژن‌ها تحت کنترل دقیق میکرو RNA ها می‌باشند. بنابرین هر گونه تغییر در بیان میکرو RNA های هدف قرار دهنده این ژن‌ها می‌تواند باعث اختلالات تنظیمی در بیان ژن‌ها شده و نهایتاً منجر به سرطان شود که با استفاده از این ویژگی می‌توان از میکرو RNA ها در تشخیص، پیشگیری و حتی اندازه‌گیری حداقل بیماری باقی‌مانده استفاده نمود. نقش میکرو RNA ها در ایجاد سرطان در انسان و از جهتی توانایی بالقوه این RNA های کوچک غیر کدکننده در درمان و تشخیص سرطان توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. در مطالعه فلامانت بعد از دو هفته درمان بیماران CML با ایماتینیب، افزایش بیان miR-150 و miR-146a و کاهش بیان miR-142-3p و miR-199b نشان داده شد(۲۵). در مطالعه پولاکوا، پروفایلینگ بیان میکروRNA با روش microarray نشان داد بیان miR-19 ، miR-221 و miR-126 افزایش و بیان miR-150 و miR-103 کاهش می‌یابد(۲۶). در مطالعه روکا کاهش بیان miR-31 ، miR-155 و miR-564 در رده‌های سلولی CML نشان داده شد(۲۷). اما در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

مطالعه حاضر هدف بررسی بیان میکرو RNA های دخیل در بیماران لوسمی میلوژنوس مزمن بود تا با شناسایی میکرو RNA هایی که در پاتوژنز CML دخیل هستند، بتوان از آن‌ها برای تشخیص، درمان و تخمین حداقل بیماری باقی‌مانده و هم چنین به عنوان عامل پیش‌آگهی دهنده استفاده کرد.

همان طور که گفته شد، هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی بیان miR-150 و miR-155 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوژنوس مزمن با روش Real-Time PCR بود. که به این منظور از گلبول‌های سفید خون محیطی بیماران تازه تشخیص داده شده CML که هیچ نوع درمانی نگرفته بودند و هم چنین افراد سالم، RNA استخراج گردید و با روش Stem-loop RT-PCR ، ساخت cDNA صورت گرفت و میزان بیان این دو میکرو RNA با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شد. نتایج نشان داد که miR-150 و miR-155 در بیماران نسبت به افراد سالم کاهش دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که miR-150 و miR-155 در لوسمی میلوژنوس مزمن بیان کاهشی دارد که می‌تواند پیشگوکننده این باشد که با القای افزایش بیان این دو میکرو RNA می‌توان از تکثیر زیاد سلول‌ها در این بیماری کاست. هم چنین به مطالعه‌های دیگری نیاز است تا با مشخص کردن ژن‌های هدف این میکرو RNA ها ، نقش دقیق آن‌ها را در این بیماری مشخص کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با مساعدت‌های مالی مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و مرکز تحقیقات بن‌یاخته انجام شده است که بدین وسیله از آن‌ها قدردانی می‌شود.

References :

1- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, *et al*. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med 2001; 344(14): 1038-42.
2- Xiong Q, Yang Y, Wang H, Li J, Wang S, Li Y, *et al*. Characterization of miRNomes in acute and chronic myeloid leukemia cell lines. Genomics Proteomics Bioinformatics 2014; 12(2): 79-91.
3- Dzikiewicz-Krawczyk A, Macieja A, Maly E, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Fichna M, *et al*. Polymorphisms in microRNA target sites modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding. J Hematol Oncol 2014; 7(1): 43.
4- Vaz C, Ahmad HM, Bharti R, Pandey P, Kumar L, Kulshreshtha R, *et al*. Analysis of the microRNA transcriptome and expression of different isomiRs in human peripheral blood mononuclear cells. BMC Res Notes 2013; 6: 390.
5- Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, *et al*. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) $CD34^+$ cells. Blood 2007; 109(10): 4399-405.
6- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435(7043): 834-8.
7- Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. Cancer Biomark 2012; 11(6): 269-80.
8- Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(8): 1273-81.
9- Lazare SS, Wojtowicz EE, Bystrykh LV, de Haan G . microRNAs in hematopoiesis. Exp Cell Res 2014; 329(2): 234-8.
10- Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. Leukemia 2008; 22(6): 1095-105.
11- Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. Blood 2008; 111(10): 5078-85.
12- Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. Cancer Res 2007; 67(10): 4553-5.
13- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res 2005; 33(20): e179.
14- Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. Eur J Haematol 2008; 81(4): 304-10.
15- Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. Eur J Haematol 2010; 84(1): 1-16.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

16- Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. Crit Rev Oncol Hematol 2010; 74(3): 149-55.
17- Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. Curr Opin Hematol 2008; 15(4): 352-8.
18- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. Oncology 1999; 13(2): 169-80; discussion 181, 184.
19- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, *et al*. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood 2006; 108(1): 28-37.
20- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75(5): 843-54.
21- Cheng J, Guo S, Chen S, Mastriano SJ, Liu C, D'Alessio AC, *et al*. An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. Cell Rep 2013; 5(2): 471-81.
22- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, *et al*. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. Blood 2007; 109(11): 4944-51.
23- Santhi WS, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S, *et al*. Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. Oral Oncol 2013; 49(6): 567-75.
24- Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, *et al*. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell 2010; 17(1): 28-40.
25- Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, Holst J, Bonnet ML, Chomel JC, *et al*. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. Haematologica 2010; 95(8): 1325-33.
26- Machova Polakova K, Lopotova T, Klamova H, Burda P, Trneny M, Stopka T, *et al*. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. Mol Cancer 2011; 10: 41.
27- Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, *et al*. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. PLoS One 2012; 7(4): e35501.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(3): 223-232

Original Article

The assessment of miR-150 and miR-155 on chronic myelogenous leukemia patients

Fallah P.[1,2], Timori Naghadeh H.[1], Soleimani M.[3], Amirizadeh N.[1], Poopak B.[4], Toogeh Gh.[5], Arefian E.[6], Bolouri Sh.[7], Golkar T.[7], Pirmohammad Jamaat Z.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Allied-Health Faculty, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[3]Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4]School of Allied Medicine, Medical Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran
[5]School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6]Biology School of Tehran University, Tehran, Iran
[7]Payvandlab Clinical & Speciality Laboratory, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Micro RNAs are a class of small non-coding RNAs which have been recently shown to play a crucial role in major cellular processes such as development and differentiation through post-transcriptional regulation. The correlation of microRNA expression levels with the pathogenesis of some hematologic malignancies including acute myeloid leukemia is already known. The aim of this study was to investigate the expression of mir-150 and mir-155 in chronic myelogenous leukemia patients. miRNA expression level changes can be used for diagnosis, treatment and estimation of Minimal Residual Disease (MRD).

Materials and Methods

In this descriptive study, the expression of miR-150 and miR-155 in 25 newly diagnosed CML patients in chronic phase and 25 healthy subjects as the control all in Payvand Medical Laboratory were examined by Stem-loop RT-PCR and Real Time PCR techniques. For data analysis, Pearson correlation analysis was used.

Results

miR-150 and miR-155 were down-regulated in CML patients rather than in healthy subjects (0.512 and 0.2552, respectively). There was no correlation between the laboratory findings and the miR expression level. But miR-155 was inversely associated with age ($p \leq 0.01$).

Conclusions

In conclusion, the decreasing expression of miR-150 and miR-155 in chronic myelogenous leukemia is indicative of their induced expression in suppressing proliferation of cells in this disease. Other studies are also required to elucidate the exact role of microRNA by identifying their target genes.

Key words: MicroRNAs, miR-150، human, miR-155، human, Leukemia، Chronic Myelogenous

Received: 15 Oct 2014
Accepted: 23 Jan 2015

Correspondence: Timori Naghadeh H., Pathologist. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 1157-14665, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88060717
E-mail: *timori13@gmail.com*
Correspondence: Soleimani M., PhD of Hematology. Associate Professor of Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: *soleim_m@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-28]