

خون

فصلنامه علمی تحقیقاتی

دوره ۱۳ شماره ۲ پاییز ۹۵ (۲۲۳-۲۱۵)

مقاله پژوهشی

بیان miR-125a-5p و miR-125a-3p در بیماران مبتلا به

تئوپلاسم‌های میلوبرولیفراتیو

شیرین فردوسی^۱، کامران عطاردی^۱، ناصر امیری‌زاده^۱، غلامرضا توکله^۱، آزیتا آذرکیوان^۱، رضا شیرکوهی^۱، محمد فرانوش^۱، محمد واعظی^۱، کامران علی مقدم^۱، اردشیر قوام‌زاده^۱، سید حمید‌الله غفاری^۱، حسین تیموری‌نقده^۱، زینب پیرمحمد جماعت^۱

چکیده

ساقه و هدف

تغییر بیان میکرو RNA می‌تواند باعث شروع و پیشرفت سرطان شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان miR-125a و ارتباط آن با JAK2 allele burden و یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به تئوپلاسم‌های میلوبرولیفراتیو شامل پلی‌سیتمی ورا (PV) و ترومبوسیتمی اساسی (ET) بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. در مجموع ۴۰ بیمار مبتلا به PV و ET در زمان تشخیص مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۰ نفر از افراد سالم نیز به عنوان کنترل وارد مطالعه شدند. میزان JAK2 V617F allele burdens quantitative miR-125a-3p و miR-125a-5p در لکوستیت‌های خون محیطی بیماران با روش SPSS^{۱۶} شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش من ویتنی قرار گرفت. برای بررسی ارتباط بین داده‌ها نیز از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد.

یافته‌ها

سطح بیان miR-125a-5p در هر دو گروه PV و ET افزایش داشت ($p=0.002$)، در گروه PV، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود ($r=0.531$ ، $p=0.01$). درصد کمی موتاسیون 2 JAK2 در پلی‌سیتمی ورا ($18/29 \pm 6.6/37\%$) و در ترومبوسیتمی اساسی ($13/95 \pm 4.4/43\%$) دیده شد ($p=0.007$).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غیر از موتاسیون 2 JAK2، تغییر بیان میکرو RNA‌ها نظری miR-125a نیز در بیماران MPN وجود دارد.

کلمات کلیدی: میکرو RNA‌ها، پلی‌سیتمی ورا، ترومبوسیتمی اساسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۷

- ۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- هماتولوژی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۵- فوق تخصص خون و انکولوژی کودکان - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و درمانگاه تالاسمی - تهران - ایران
- ۶- متخصص ژنتیک پزشکی - استادیار انتسابی کانسر بیمارستان امام خمینی - دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۷- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران - بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص) - تهران - ایران
- ۸- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۹- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۱۰- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - کارگر شمالی - تهران - ایران - کدپستی: ۱۴۱۱۱
- ۱۱- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۴۶۹

بیماری‌زایی، تشخیص افتراقی زیر گروه‌های MPN و نیز تارگت درمانی مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مراجعه کننده به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام خمینی بررسی شدند. تعداد ۱۰ نفر نیز از افراد سالم به عنوان کنترل وارد مطالعه شدند. تشخیص بیماران بر اساس معیارهای PVSG (Polycitemia Vera Study Group) (۱۲). داده‌های مربوط به بیماران وارد SPSS شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش Mann-Whitney Test قرار گرفت. برای بررسی ارتباط بین داده‌ها نیز از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد.

استخراج DNA و بررسی *JAK2 V617F allele burden*: استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت یکتا تجهیز آزمایشگاهی، ایران) انجام گرفت. جهت تعیین موتاسیون Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain (ARMS-PCR) از روش JAK2V617F (۱۳). برای تعیین *JAK2 V617F allele burden* در نمونه‌های دارای موتاسیون، کیت تشخیصی (AB analitica, Real Quality RS-JAK2V617F Q PCR) به کار گرفته شد. طبق دستورالعمل کیت، مقدار ۵ میکرولیتر از DNA به ۲۰ میکرولیتر از محلول RQ-PCR premix (هم برای نمونه موتانت و هم نمونه نرمال) اضافه شد. برای رسم منحنی استاندارد از استانداردهای موتانت و نرمال با غایضت مشخص (μL) copies $/\mu\text{L}$ ، ۲۰۰۰۰۰، ۲۰۰۰، ۲۰۰، ۲۰ که در کیت موجود بود استفاده و مقدار موتاسیون JAK2V617F به صورت درصد گزارش شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در ۳۵ چرخه با استفاده از دستگاه Rotor-Gene ۶۰۰۰ Real-time (کیاژن) انجام گرفت. واکنش PCR به صورت دمای ابتدایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به

پلی‌سیتمی‌ورا (PV)، ترومبوسیتمی اساسی (ET) و میلوپرولیفراتیو (MPF) که مجموعاً تحت عنوان نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPN) طبقه‌بندی می‌شوند، یک گروه هتروژن از بیماری‌هایی هستند که در آن‌ها یک اختلال کلونال اولیه در سطح سلول بنیادی خونساز وجود دارد. موتاسیون 2 JAK در تقریباً ۷۵-۹۰ درصد بیماران PV و در ۳۰-۵۰ درصد بیماران ET و PMF گزارش شده است (۱-۳). شناسایی این موتاسیون در همه زیر گروه‌های MPN با فنوتیپ مجزا (PMF و ET، PV)، فقدان موتاسیون در تعدادی از این بیماران و نیز شناسایی آن در تعدادی از اختلالات دیگر ثابت می‌کند که موتاسیون JAK2 تنها عامل بیماری‌زای نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو نیست. بنابراین به دلیل ماهیت غیر اختصاصی موتاسیون JAK2 V617F، شناسایی بیومارکرهای جدید می‌تواند در درک بیماری‌زایی و افتراق این گروه از بیماری‌ها کمک کننده باشد. اخیراً مشخص شده که میکرو RNA ها از جمله خانواده miR-125 در شروع و پیشرفت تعدادی از سرطان‌ها دخالت دارند (۴-۸). میکرو RNA ها، مولکول‌های RNA کوچک و تک رشته‌ای هستند که مکمل بخش ۳' UTR از m RNA یک ژن کدکننده دیگر می‌باشند که پس از اتصال به mRNA هدف، با تجزیه یا ممانعت از ترجمه، بیان ژن و تولید پروتئین هدف را مختل می‌کنند (۹).

تغییر بیان پروفایل miRNA در بیماران MPN در طی تمایز اریتروئید هم چنین در گرانولوسيت‌ها، پلاکت‌ها و رتیکولوسيت‌های خون محیطی گزارش شده است (۱۱-۱۰). با این وجود، نحوه بیان miR-125a در MPN و نیز Mوتاسیون JAK2 هنوز به طور کامل شناخته نشده است. از این رو در این مطالعه به طور اختصاصی تغییر بیان miR-125a در دو گروه شایع از نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (پلی‌سیتمی‌ورا و ترومبوسیتمی اساسی) بررسی شد تا ارتباط آن با فنوتیپ بیماری، یافته‌های آزمایشگاهی و موتاسیون JAK2 هنوز به طور کامل شناخته نشده است. از این رو در این مطالعه به طور اختصاصی تغییر بیان miR-125a در دو گروه شایع از نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (پلی‌سیتمی‌ورا و ترومبوسیتمی اساسی) بررسی شد تا ارتباط آن با پارامترهای هماتولوژیک و نیز درصد کمی موتاسیون JAK2 مشخص شود. زیرا شناسایی بیان نابهای یک میکرو RNA اختصاصی می‌تواند در درک

۴۳ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و پس از آن در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برای غیر فعال کردن RT انجام گرفت (جدول ۱). جهت آنالیز بیان رن miRNA از Quantitative real time PCR استفاده شد.

مقدار سایبروگرین مورد استفاده ۱۰ میکرولیتر، مقدار C DNA مورد استفاده یک میکرولیتر بود و از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی برای میکرو DNA، به مقدار یک میکرولیتر استفاده شد. برنامه PCR استفاده شده برای برسی بیان رن miRNA به ترتیب عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه که با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه ادامه یافت، برای اتصال آغازگرها دمای ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد.

جدول ۱: مواد و مقادیر استفاده شده جهت ساخت cDNA از miRNA

مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله اول ساخت cDNA از miRNA	
غلظت نهایی در محیط	ماده
۲ μ L	Poly A polymerase buffer
۱ μ L	ATP (۱۰ mM)
۰/۵ μ L	Poly A enzyme
۲۰۰ ng	RNA
۲۰ μ L	Total volume (by DEPC water)

مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله دوم ساخت cDNA از miRNA	
غلظت نهایی در محیط	ماده
۲ μ L	۵ x reaction buffer
۱ μ L	dNTP mix (۱۰ mM)
۰/۵ μ L	RT enzyme
۰/۵ μ L	Mir cDNA syn specific (۱۵ pmol) primer
۵ μ L	RNA poly tail
۱۰ μ L	Total Volume

در مطالعه حاضر از RNAU6 به عنوان کنترل داخلی جهت طبیعی سازی اطلاعات RQ-PCR استفاده شد. علت

مدت ۲۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد.

استخراج میکرو RNA:

استخراج RNA توالت شامل RNA های کوچک (microRNA) با استفاده از ترایزول انجام گرفت. به طور خلاصه، به سلول های مورد نظر ۱۰۰۰-۸۰۰ میکرو لیتر محلول ترایزول اضافه و به آرامی محتويات تیوب چندین بار پیپت شد تا سلول ها در ترایزول حل شوند. سپس محلول حاصله به تیوب مناسب منتقل و تیوب به مدت ۵-۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم اضافه و میکروتیوب به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. تیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ دو فاز تشکیل گردید. فاز رویی حاوی RNA بوده که به آرامی جداسازی و به تیوب های RNase free منتقل شد. به محلول به دست آمده به صورت هم حجم ایزوپرپانول اضافه و به آرامی مخلوط و تیوب به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. تیوب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی توسط سمپلر جدا و به رسوب ته تیوب ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. تیوب به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۷۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و رسوب باقیمانده در تیوب در ۳۰-۵۰ میکرو لیتر DEPC Water حل شد.

ساخت cDNA و برسی آنالیز بیان miRNA با Quantitative real time PCR

پس از استخراج RNA و اندازه گیری غلظت آن توسط دستگاه نانودرایپ، cDNA مربوط به miRNA با استفاده از cDNA شرکت پارس زنوم، ایران) ساخته شد. ساخت cDNA شامل دو مرحله بود: مرحله اول شامل افزودن آنزیم Poly A Polymerase که این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و مرحله دوم شامل ساخت رشته اول cDNA که این واکنش در دمای

بیماران پلی‌سیتمی‌ورا ، موتاسیون JAK2 با هیچ کدام از پارامترهای هماتولوژیک معنادار نبود اما بیماران ET دارای موتاسیون، میزان لکوسیت و هموگلوبین بالاتری داشتند(جدول ۳). درصد کمی موتاسیون JAK2 در گروه پلی‌سیتمی‌ورا ($18/29 \pm 6.6\%$) و در گروه ترومبوسیتمی اساسی ($13/95 \pm 4.0\%$) دیده شد($p=0.007$).

در گروه پلی‌سیتمی‌ورا ، ارتباط *JAK2 V617F allele burden* با لکوسیت، هموگلوبین و پلاکت معنادار نبود. در گروه ET ، ارتباط بین *JAK2 V617F allele burden* و لکوسیت معنادار بود($p=0.004$) اما با شمارش پلاکت و هموگلوبین معنادار نبود.

انتخاب RNAU6 ، بر پایه مطالعه‌های قبلی بود که جهت بررسی بیان miRNA ها در خون و مغز استخوان بیماران مبتلا به پلی‌سیتمی‌ورا و ترومبوسیتمی اساسی به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است(۱۴-۱۶). پس از انجام واکنش‌های PCR ، تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

با استفاده از روش ARMS-PCR ، از ۲۰ بیمار مبتلا به پلی‌سیتمی‌ورا، ۱۸ نفر دارای موتاسیون بودند(۹۰%). به علاوه موتاسیون در ۱۵ بیمار از ۲۰ بیمار مبتلا به ترومبوسیتمی اساسی(۷۵٪) شناسایی شد(جدول ۲). در

جدول ۲ : ویژگی‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران مورد مطالعه

PV (n= ۲۰)	ET (n= ۲۰)	بیماران
۹/۱۱	۸/۱۲	جنس (زن/مرد)
۴۷ (۱۷-۸۱)	۵۹ (۲۵-۷۵)	(median, range)
۱۰/۱ (۵/۸-۱۶/۹)	۸/۹ (۲/۳-۱۰/۱)	White blood cell counr ($\times 10^9 /L$) ، Median (range)
۱۹ (۱۶/۷-۲۲/۵)	۱۴/۲ (۱۱/۲-۱۶)	Hemoglobin (g/dL), median (range)
۳۲۱ (۱۰۴-۷۰۰)	۸۰۲ (۵۸۳-۱۰۶۰۰)	Platelet count, ($\times 10^9 /L$) ، Median (range)
(٪۴۰) ۸	۰	بزرگی طحال(درصد)
(٪۸۰) ۱۸	(٪۷۵) ۱۵	<i>JAK2V617F (+)(%)</i>

جدول ۳ : ارتباط موتاسیون *JAK2* با یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی

Plt $\times 10^9 /L$ median (range)		Hb (g/dL) متوسط (range)		WBC $\times 10^9 /L$ متوسط (range)		اسپلنتومگالی دارد/ندارد	سن (متوسط)	زن/ مرد	تعداد (٪)	بیماران
p= .۱	۳۷۸ (۱۰۴-۷۰۰)	p= .۱	۱۹/۲ (۱۳-۲۱)	p= .۱	۱۱ (۷/۴-۱۶/۹)	۶/۱۲	۴۸	۸/۱۰	۱۸ (۹۰)	JAK2V617
	۲۲۰ (۱۳۷-۳۲۴)		۱۸ (۱۵/۶-۲۲)		۷/۴ (۵/۸-۱۵)	۲/۰	۳۰	۱/۱	۲ (۱۰)	JAK2 Wild-type
p= .۲	۷۸۲ (۵۸۳-۱۰۴۷)	p= .۰/۰	۱۴ (۱۳-۱۶)	p= .۰/۰	۱۰ (۸/۵-۱۱/۴)	۰/۱۵	۵۹	۶/۹	۱۵ (۷۵)	JAK2V617
	۹۰۷ (۶۰۰-۱۰۶۷)		۱۳ (۱۱-۱۵/۵)		۶/۵ (۲/۳-۱۲/۳)	۰/۵	۵۵	۴/۱	۵ (۲۵)	JAK2 Wild-type

جدول ۴: سطوح بیان miRNA های مورد بررسی در گروه بیماران مبتلا به PV (n= ۲۰) و ET (n= ۲۰) در مقایسه با گروه کنترل (n= ۱۰)

p-value	میانگین Fold change	بیماران (n = ۲۰)		میکرو RNA مورد بررسی
		کنترل (n = ۱۰) Mean ± SD	Mean ± SD	
۰/۰۰۳	۶	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۱۲ ± ۰/۰۱۶	MiR-125a-5P (بیماران پلی‌سیتمی ورا)
۰/۰۰۲	۸	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۱۶ ± ۰/۰۱۷	MiR-125a-5P (بیماران ترومبوسیتمی اساسی)
۰/۱	۰/۶	۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۶ ± ۰/۰۰۱	MiR-125a-3P (بیماران پلی‌سیتمی ورا)
۰/۱	۰/۳	۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۳ ± ۰/۰۰۰۲	MiR-125a-3P (بیماران ترومبوسیتمی اساسی)

تغییر بیان miRNA (۱۷). در واقع نتایج مطالعه‌های اخیر نشان داده که تغییر بیان miRNAs با بدخیمی‌های هماتولوژیک به خصوص لوکمی مرتبط است (۱۸). هر چند که در بسیاری از لوکمی‌های دیگر تغییر بیان- miR-125 گزارش شده اما مطالعه در مورد این میکرو RNA در بیماران MPNs محدود بوده است. در واقع همانند موتاسیون JAK2 که می‌تواند باعث افزایش حساسیت به سایتوکاین‌ها و در نتیجه افزایش پرولیفراسیون سلولی شود افزایش miR-125 نیز با تاثیر بر بیان تارگت‌های مختلف ankyrin repeat and BTB (POZ) domain (ABTB1 و PTPN18) و پروتئین‌های فسفاتاز نظری Protein Tyrosine Phosplatase, Non-Receptor Type 18 (Protein Phosphatase 1 Calalytic Subunit PPP1CA) می‌تواند منجر به افزایش حساسیت به سایتوکاین Alpha (۱۹، ۲۰). اما نتایج این مطالعه‌ها، بیشتر بر پایه مطالعه‌های in vivo و از طریق دستکاری‌های ژنتیکی بوده و مطالعه‌ای که به طور سیستماتیک به بررسی بیان- miR-125a در لکوسیت‌های خون محیطی بیماران PV و ET پرداخته باشد، انجام نگرفته است. از این رو در مطالعه حاضر تغییر بیان miR-125a-5p و miR-125a-3p در لکوسیت‌های خون محیطی بیماران PV و ET بررسی و مشخص شد که سطح بیان miR-125a-5p در هر دو گروه PV و ET افزایش می‌باشد (p= ۰/۰۰۳، r= ۰/۰۰۲). در گروه PV، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود (p= ۰/۰۳۱، r= ۰/۰۱). ارتباط بیان این دو میکرو RNA در هر دو گروه PV و ET با JAK2 V617F allele burden معنادار نبود.

سطوح دو miR-125a-5p و miR-125b-5p شامل miRNA به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود. میانگین تغییر در بیان برای miR-125a-5p در گروه پلی‌سیتمی ورا ۶ و در گروه ترومبوسیتمی اساسی ۸ بود. (جدول ۴). در گروه پلی‌سیتمی ورا، ارتباط بین- 5p و شمارش پلاکت معنادار بود (p= ۰/۰۱، r= ۰/۰۳۱). در هر دو گروه پلی‌سیتمی و ترومبوسیتمی اساسی، ارتباط miR-125a-5p با JAK2 V617F allele burden ۱25a-3p معنادار نبود.

بحث

این حقیقت که موتاسیون V617F در بیماران با فنوتیپ MPN (Myeloproliferative Neoplasms) مختلف یافت می‌شود، وجود دیگر عوامل پاتوژنیک کمک‌کننده را بیان می‌کند که موجب تکثیر در رده‌های میلوبیلیدی خاص می‌شود. شناسایی این موتاسیون باعث ایجاد سؤالاتی شده که پاسخ به آن‌ها هنوز نامشخص است. اول این که چرا یک موتاسیون منفرد در چنین شیوع بالایی در اختلالات میلوبیلید اما نه در دیگر بدخیمی‌ها اتفاق می‌افتد؟ دوم این که چگونه یک موتاسیون منفرد با پاتوژن بیماری‌های مجزا از نظر فنوتیپی مرتبط است؟ و سوم این که اگر چه تقریباً همه بیماران پلی‌سیتمی ورا و تقریباً نیمی از بیماران ترومبوسیتمی اولیه دارای موتاسیون JAK2 هستند، چرا بیماران باقی‌مانده مبتلا به PV و ET، موتاسیون JAK2 قابل شناسایی ندارند؟ برای توضیح این مسئله نظرات متعددی ارایه شده است نظری: سطوح متغیر فعالیت کیناز JAK2 (تئوری بار موتاسیون)، زمینه ژنتیکی افراد، یک فرآیند مولکولی قبل از JAK2، مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک و

بنابراین مشخص شد که miR-125a می‌تواند به عنوان یک شاخص پیشگویی‌کننده و یک هدف درمانی در بیماران MDS به کار رود. مطالعه‌های گسترده‌ای در مورد تغییر بیان میکرو RNA در بیماران MPN انجام گرفته و مشخص شده که بعضی از این میکرو RNAها با درصد کمی موتاسیون JAK2 ارتباط دارند (جدول ۵).

هر چند در یک مطالعه درباره پروفایل بیان miRNA در بیماران PV، هیچ گونه ارتباطی ما بین سطوح بیان CD34⁺ miRNA و JAK2V617F allele burden مشاهده نشد (۲۲).

اخیراً در یک مطالعه توسط ژان، افزایش بیان mir-125a-3p در سلول‌های CD34⁺ خون محیطی بیماران PV گزارش شده اما در مطالعه حاضر چنین نتیجه‌ای حاصل نشد که این تفاوت بیان می‌تواند به دلیل نوع سلول مورد بررسی و هم چنین نوع روش به کار رفته جهت تشخیص باشد (۱۶). در مطالعه ژان از روش آنالیز میکرواری جهت تشخیص بیان افتراقی میکرو RNA استفاده شده است. در مطالعه ایرن مشخص شد که بیان miR-125a در سلول‌های CD34⁺ در مغز استخوان بیماران MDS، افزایش بیان دارد و بیان miR-125a به طور معکوس با بقاء بیماران مرتبط بود (۲۱).

جدول ۵: تغییر بیان miRNA در نوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (مطالعه‌های انجام گرفته در نمونه‌های اولیه بیماران)

❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان 155-150- miR-451 و افزایش بیان miR-150 در طی تمایز اریتروئیدی سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی از بیماران PV در آزمایشگاه. سطوح بالاتر miR-451 در سلول‌های PV CD34 ⁺ نسبت به کترل‌های نرمال (۱۱)).
❖ تغییر بیان MiRNA در گرانولوسيت‌ها، سلول‌های مونونوکلئر، پلاکت‌ها و رتیکولوسيت‌ها، به عنوان مثال افزایش بیان miR-143 و miR-145 در سلول‌های مونونوکلئر PV، کاهش بیان 150 miR-145 در رتیکولوسيت‌های PV (۱۰).
❖ افزایش بیان 2 miR-16-2 در سلول‌های PV CD34 ⁺ بیماران PV. افزایش بیان 2 miR-16-2 در سلول‌های PV CD34 ⁺ نرمال، پرولیفراسیون و تمایز اریتروئید را تحریک می‌کند، در حالی که مهار 2 miR-16-2 در سلول‌های PV CD34 ⁺ تشکیل کلونی اریتروئید را کاهش می‌دهد (۲۳).
❖ افزایش بیان miR-575 و miR-887 و miR-196B و کاهش بیان miR-551B و miR-196B در سلول‌های PV CD34 ⁺ خون محیطی بیماران زن و مرد PV. افزایش بیان miR-451 و miR-145 در سلول‌های PV CD34 ⁺ خون محیطی بیماران PV در مقایسه با کترل‌های سالم (۱۶).
❖ تغییر بیان MiRNA در سلول‌های PV CD34 ⁺ و گرانولوسيت‌های خون محیطی بیماران PMF (۲۴).
❖ افزایش بیان miR-28 در ۳۰٪ از پلاکت‌های بیماران MPN، PV، ET و ارتباط با JAK2V617F allele burden (PMF، PV، ET، MPN) مهار تمایز مگاکاربوزیت‌های سلول‌های PV CD34 ⁺ انسان توسط miR-28 (۲۵).
❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-133A در نوتروفیل‌های خون محیطی بیماران MPN (۲ ET و ۴ PV) در مقایسه با کترل (۲۶)).
❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-34A در گرانولوسيت‌های بیماران ET, PV و PMF در مقایسه با کترل‌ها (۲۴)).
❖ افزایش بیان miR-451 و miR-451 در سلول‌های کلونی PV BFU-E در مقایسه با سلول‌های کلونی ET BFU-E (هم کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسيت‌های PV که به طور معکوس با فرکانس JAK2 V617F-negative با (JAK2V617F-positive) (۱۶)).
❖ کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسيت‌های PV ارتباط افزایش بیان 182 با JAK2 V617F allele burden miR-182 با (۱۰) JAK2 V617F-positive (۲۴).
❖ کاهش بیان miR-342 در PMF, PV و ET و ارتباط معکوس با JAK2 V617F allele burden miR-182 با (۱۰) JAK2 V617F allele burden (۲۴).
❖ افزایش بیان miR-10a در Total RNA مغز استخوان بیماران ET و PMF، کاهش بیان miR-150 در PV و PMF. ارتباط بین بیان miR-150 با JAK2 V617F allele burden (۱۵).
❖ افزایش بیان miR-143 در سلول‌های مونونوکلئر بیماران MPNs و ارتباط آن با JAK2 V617F allele burden (۱۴).

مواردی که بیماری به سمت لوکمی پیشرفت کرده می‌تواند به عنوان زمینه‌ای جهت تحقیقات آینده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل نتایج پایان‌نامه PhD مصوب مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد. بدین وسیله از مسئولین مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی و امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت جمع‌آوری نمونه‌های بیماران تشکر و قدردانی می‌شود.

این نشان می‌دهد که تغییر بیان بیشتر miRNAs به صورت یک پدیده مستقل از سیگنالینگ غیر طبیعی در پاتوژن MPN و تعیین فنوتیپ بیماری عمل می‌کند. در مطالعه حاضر نیز ارتباط بین JAK2 V617F allele burden با miR-125a-3p و miR-125a-5p معنادار نبود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غیر از موتاسیون JAK2، تغییر بیان میکرو RNA‌ها نظیر miR-125 نیز در بیماران MPN وجود دارد. از این رو بررسی تغییر بیان miR-125 در فازهای مختلف بیماری و به خصوص در

References :

- 1- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365(9464): 1054-61.
- 2- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, *et al.* Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108(4): 1377-80.
- 3- Levine RL, Gilliland DG. JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(1): 43-7.
- 4- Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG. The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia* 2009; 11(1): 1208-15.
- 5- Jiang L, Huang Q, Zhang S, Zhang Q, Chang J, Qiu X, *et al.* Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC Cancer* 2010; 10: 318.
- 6- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 2007; 282(2): 1479-86.
- 7- Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, *et al.* Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006; 5: 24.
- 8- Jia HY, Wang YX, Yan WT, Li HY, Tian YZ, Wang SM, *et al.* MicroRNA-125b Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci* 2012; 13(7): 8762-74.
- 9- Ambros V. The evolution of our thinking about microRNA. *Nat Med* 2008; 14(10): 1036-40.
- 10- Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 2008; 93(7): 1009-16.
- 11- Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol* 2007; 35(11): 1657-67.
- 12- Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology* 2005; 2005(1): 201-8.
- 13- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106(6): 2162-8.
- 14- Benati M, Montagnana M, Danese E, De Matteis G, Veneri D, Paviati E, *et al.* Role of JAK2 V617F mutation and aberrant expression of microRNA-143 in myeloproliferative neoplasms. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(7): 1005-11.
- 15- Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, Feller AC, Merz H. MicroRNA expression and JAK2 allele burden in bone marrow trephine biopsies of polycythemia vera, essential thrombocythemia and early primary myelofibrosis. *Acta Haematol* 2013; 129(4): 251-6.
- 16- Zhan H, Cardozo C, Yu W, Wang A, Moliterno AR, Dang CV, *et al.* MicroRNA deregulation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(3): 190-5.
- 17- Guglielmelli P, Tozzi L, Bogani C, Bartalucci N, Salati S, Manfredini R, *et al.* Dysregulated expression of MicroRNA-16 contributes to abnormal erythropoiesis in patients with polycythemia vera. *Blood* 2008; 112(11): 179.
- 18- Fernando TR, Rodriguez-Malave NI, Rao DS. MicroRNAs in B cell development and malignancy. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 7.
- 19- Bousquet M, Nguyen D, Chen C, Shields L, Lodish

- HF. MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA. *Haematologica* 2012; 97(11): 1713-21.
- 20- Guo S, Bai H, Megyola CM, Halene S, Krause DS, Scadden DT, *et al.* Complex oncogene dependence in microRNA-125a-induced myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(41): 16636-41.
- 21- Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, Pierce S, Bueso-Ramos C, Calin G, *et al.* Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF-κB activation and enhances erythroid differentiation arrest. *PLoS One* 2014; 9(4): e93404.
- 22- Zhan H, Cardozo C, Yu W, Wang A, Moliterno AR, Dang CV, *et al.* MicroRNA deregulation in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(3): 190-5.
- 23- Guglielmelli P, Tozzi L, Bogani C, Iacobucci I, Ponziani V, Martinelli G, *et al.* Overexpression of microRNA-16-2 contributes to the abnormal erythropoiesis in polycythemia vera. *Blood* 2011; 117(25): 6923-7.
- 24- Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Ponziani V, *et al.* MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients. *Exp Hematol* 2007; 35(11): 1708-18.
- 25- Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, *et al.* miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood* 2010; 116(3): 437-45.
- 26- Slezak S, Jin P, Caruccio L, Ren J, Bennett M, Zia N, *et al.* Gene and microRNA analysis of neutrophils from patients with polycythemia vera and essential thrombocytosis: down-regulation of micro RNA-1 and-133a. *J Transl Med* 2009; 7: 39.

Original Article

Expression analysis of miR-125a-3p and miR-125a-5p in patients with myeloproliferative neoplasm

*Ferdowsi Sh.¹, Atarodi K.¹, Amirizadeh N.¹, Toogeh Gh.², Azarkeivan A.^{1,3},
Shirkooohi R.⁴, Faranoush M.⁵, Vaezi M.⁶, Alimoghaddam K.⁷, Ghavamzadeh A.⁷,
Ghaffari S.H.⁷, Timori Naghadeh H.¹, Pirmohammad Jamaat Z.¹*

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Adult Thalassemia Clinic, Tehran, Iran

⁴Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Iran University of Medical Sciences, Rasool Akram Hospital, Tehran, Iran

⁶Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Deregulation of microRNA (miRNA) expression can lead to cancer initiation and progression. The aim of this study was to investigate miR-125a expression level in patients with myeloproliferative neoplasm and its correlation with JAK2 allele burden and laboratory findings.

Materials and Methods

This is an experimental study. In total, 20 patients with Polycythemia Vera (PV) and 20 patients with essential thrombocythemia(ET) were examined. Ten healthy subjects were checked as controls. We performed JAK2 V617F allele burdens measurement by quantitative real-time polymerase chain reaction. Expression analysis of miR-125a-3p and miR-125a-5p was performed by Real-time RT-PCR. Results were analyzed by SPSS 16 software and Mann-Whitney test and Spearman's correlation was applied for analysis.

Results

miR-125a-5p was up regulated in both PV ($p = 0.003$) and ET patients ($p = 0.002$). In PV group, a significant correlation was observed between miR-125a-5p and platelet counts ($p = 0.01$, $r = 0.531$). The median allele burden of the JAK2 V617F was 66% (62.37 ± 18.29) for patients with PV and 40% (43.4 ± 13.95) for patients with ET ($p = 0.007$).

Conclusions

In conclusion, our data indicate that there is the aberrant expression of miRNAs such as miR-125a in MPNs patients except JAK2 mutation.

Key words: MicroRNAs, Polycythemia Vera, Thrombocythemia, Essential

Received: 14 Apr 2015

Accepted: 8 Sep 2016

Correspondence: Ghaffari SH., PhD of Molecular Genetics. Associate Professor of Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street. Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax: (+9821) 88004140

E-mail: shghaffari@tums.ac.ir

Correspondence: Timori Naghadeh H., Pathologist. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88060717
E-mail: timori13@gmail.com