

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

### نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو

شیرین فردوسی<sup>۱</sup>، کامران عطاردی<sup>۲</sup>، ناصر امیری زاده<sup>۳</sup>، غلامرضا توگه<sup>۴</sup>، آریتا آذرکیوان<sup>۵</sup>، رضا شیرکوهی<sup>۶</sup>، محمد فرانش<sup>۷</sup>، محمد واعظی<sup>۸</sup>، کامران علی مقدم<sup>۹</sup>، اردشیر قوام زاده<sup>۱۰</sup>، سید حمیداله غفاری<sup>۱۱</sup>، حسین تیموری نقده<sup>۱۲</sup>، زینب پیرمحمد جماعت<sup>۱۳</sup>

#### چکیده

#### سابقه و هدف

تغییر بیان میکرو RNA می تواند 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 نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو شامل پلی سیتمی 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 و نیز سطح بیان miR-125a-3p و miR-125a-5p در لکوسیت‌های خون محیطی بیماران با روش quantitative real-time polymerase chain reaction بررسی شد. داده‌های مربوط به بیماران وارد 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 ( $p=0/003$ ،  $p=0/002$ ). در گروه PV، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود ( $r=0/531$ ،  $p=0/01$ ). درصد کمی موتاسیون JAK2 در پلی سیتمی ورا ( $18/29 \pm 62/37$ ) / ۶۶٪ و در ترومبوسیتمی اساسی ( $43/95 \pm 43/4$ ) / ۴۰٪ دیده شد ( $p=0/007$ ).

#### نتیجه گیری

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

**کلمات کلیدی:** میکرو RNA ها، پلی سیتمی ورا، ترومبوسیتمی اساسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۷

۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD 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 انستیتو 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 آسیب شناسی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

## مقدمه

پلی سیتمی ورا (PV)، ترومبوسیتمی اساسی (ET) و میلو فیبروز اولیه (PMF) که مجموعاً تحت عنوان نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو (MPN) طبقه بندی می شوند، یک گروه هتروژن از بیماری هایی هستند که در آن ها یک اختلال کلونال اولیه در سطح سلول بنیادی خونساز وجود دارد. موتاسیون JAK2 در تقریباً ۹۰-۷۵ درصد بیماران PV و در ۵۰-۳۰ درصد بیماران ET و PMF گزارش شده است (۱-۳). شناسایی این موتاسیون در همه زیر گروه های MPN با فنوتیپ مجزا (PV، ET و PMF)، فقدان موتاسیون در تعدادی از این بیماران و نیز شناسایی آن در تعدادی از اختلالات دیگر ثابت می کند که موتاسیون JAK2 تنها عامل بیماری زای نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو نیست. بنابراین به دلیل ماهیت غیر اختصاصی موتاسیون JAK2 V617F، شناسایی بیومارکرهای جدید می تواند در درک بیماری زایی و افتراق این گروه از بیماری ها کمک کننده باشد. اخیراً مشخص شده که میکرو RNA ها از جمله خانواده miR-125 در شروع و پیشرفت تعدادی از سرطان ها دخالت دارند (۴-۸). میکرو RNA ها، مولکول های RNA کوچک و تک رشته ای هستند که مکمل بخش 3' UTR از mRNA یک ژن کدکننده دیگر می باشند که پس از اتصال به mRNA هدف، با تجزیه یا ممانعت از ترجمه، بیان ژن و تولید پروتئین هدف را مختل می کنند (۹).

تغییر بیان پروفایل miRNA در بیماران MPN در طی تمایز اریتروئید هم چنین در گرانولوسیت ها، پلاکت ها و رتیکولوسیت های خون محیطی گزارش شده است (۱۱)، (۱۰). با این وجود، نحوه بیان miR-125a در MPN و نیز ارتباط آن با فنوتیپ بیماری، یافته های 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 نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو (پلی سیتمی ورا و ترومبوسیتمی اساسی) بررسی شد تا ارتباط آن با پارامترهای هماتولوژیک و نیز درصد کمی موتاسیون JAK2 مشخص شود. زیرا شناسایی بیان نابه جای یک میکرو RNA اختصاصی می تواند در درک

بیماری زایی، تشخیص افتراقی زیر گروه های MPN و نیز تارگت درمانی مؤثر باشد.

## مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به نئوپلاسم های 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 (Polycythemia Vera Study Group) بود (۱۲). داده های مربوط به بیماران وارد SPSS ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش Mann-Whitney Test قرار گرفت. برای بررسی ارتباط بین داده ها نیز از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد.

## استخراج DNA و بررسی JAK2 V617F allele burden:

استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام گرفت. جهت تعیین موتاسیون JAK2V617F از روش ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) استفاده شد (۱۳). برای تعیین JAK2 V617F allele burden در نمونه های دارای موتاسیون، کیت تشخیصی Real Quality RS-JAK2V617F Q (ایتالیا، AB analitica) به کار گرفته شد. طبق دستورالعمل کیت، مقدار ۵ میکرو لیتر از DNA به ۲۰ میکرو لیتر 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 غلظت مشخص (۲۰۰۰۰، ۲۰۰۰، ۲۰۰، ۲۰ copies/μL) که در کیت موجود بود استفاده و مقدار موتاسیون JAK2V617F به صورت درصد گزارش شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر و در ۳۵ چرخه با استفاده از دستگاه Real-time ۶۰۰۰ Rotor-Gene (کیژن) انجام گرفت. واکنش PCR به صورت دمای ابتدایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به

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

#### استخراج میکرو RNA:

استخراج RNA توتال شامل RNA های کوچک (microRNA) با استفاده از ترايزول انجام گرفت. به طور خلاصه، به سلول‌های مورد نظر ۱۰۰۰-۸۰۰ میکرو لیتر محلول ترايزول اضافه و به آرامی محتویات تیوب چندین بار پیست شد تا سلول‌ها در ترايزول حل شوند. سپس محلول حاصله به تیوب مناسب منتقل و تیوب به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ دو فاز تشکیل گردید. فاز روئی حاوی RNA بوده که به آرامی جداسازی و به تیوب‌های RNase free منتقل شد. به محلول به دست آمده به صورت هم حجم ایزوپروپانل 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 سانتی‌گراد در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع روئی توسط سمپلر جدا و به رسوب ته تیوب ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. تیوب به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفوژ شد. مایع روئی جدا و رسوب باقی مانده در تیوب در ۵۰-۳۰ میکرو لیتر DEPC Water حل شد.

#### ساخت cDNA و بررسی آنالیز بیان miRNA با Quantitative real time PCR:

پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری غلظت آن توسط دستگاه نانودراپ، cDNA مربوط به miRNA با استفاده از کیت (شرکت پارس ژنوم، ایران) ساخته شد. ساخت cDNA شامل دو مرحله بود: مرحله اول شامل افزودن آنزیم Polymerase A که این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و مرحله دوم شامل ساخت رشته اول cDNA که این واکنش در دمای

۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و پس از آن در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه برای غیر فعال کردن RT انجام گرفت (جدول ۱). جهت آنالیز بیان ژن miRNA از Quantitative real time PCR استفاده شد. مقدار سایبروگرین مورد استفاده ۱۰ میکرو لیتر، مقدار C DNA مورد استفاده یک میکرو لیتر بود و از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی برای میکرو DNA، به مقدار یک میکرو لیتر استفاده شد. برنامه PCR استفاده شده برای بررسی بیان ژن miRNA به ترتیب عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه که با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه ادامه یافت، برای اتصال آغازگرها دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 μL                                                      | Poly A polymerase buffer               |
| ۱ μL                                                      | ATP (۱۰ mM)                            |
| ۰/۵ μL                                                    | Poly A enzyme                          |
| ۲۰۰ ng                                                    | RNA                                    |
| ۲۰ μL                                                     | Total volume (by DEPC water)           |
| مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله دوم ساخت cDNA از miRNA |                                        |
| غلظت نهایی در محیط                                        | ماده                                   |
| ۲ μL                                                      | ۵ x reaction buffer                    |
| ۱ μL                                                      | dNTP mix (۱۰ mM)                       |
| ۰/۵ μL                                                    | RT enzyme                              |
| ۰/۵ μL                                                    | Mir cDNA syn specific (۱۵ pmol) primer |
| ۵ μL                                                      | RNA poly tail                          |
| ۱۰ μL                                                     | Total Volume                           |

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

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

### یافته ها

با استفاده از روش ARMS-PCR ، از ۲۰ بیمار مبتلا به پلی سیتی ورا ، 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

بیماران پلی سیتی ورا ، 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 پلی سیتی ورا ( $18/29 \pm 62/37$ ٪) و در گروه ترومبوسیتمی اساسی ( $13/95 \pm 43/4$ ٪) دیده شد ( $p=0/007$ ).

در گروه پلی سیتی ورا ، 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.

جدول ۲: ویژگی های آزمایشگاهی و بالینی بیماران مورد مطالعه

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

جدول ۳: ارتباط موتاسیون JAK2 با یافته های آزمایشگاهی و بالینی

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

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)

| miRNA مورد بررسی                        | بیماران (n= ۲۰)<br>Mean ± SD | کنترل (n= ۱۰)<br>Mean ± SD | میانگین<br>Fold change | p-value |
|-----------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------|---------|
| MiR-125a-5P (بیماران پلی سیتمی ورا)     | ۰/۰۱۲ ± ۰/۰۱۶                | ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳              | ۶                      | ۰/۰۰۳   |
| MiR-125a-5P (بیماران ترومبوسیتمی اساسی) | ۰/۰۱۶ ± ۰/۰۱۷                | ۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳              | ۸                      | ۰/۰۰۲   |
| MiR-125a-3P (بیماران پلی سیتمی ورا)     | ۰/۰۰۰۶ ± ۰/۰۰۰۱              | ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۳              | ۰/۶                    | ۰/۱     |
| MiR-125a-3P (بیماران ترومبوسیتمی اساسی) | ۰/۰۰۰۳ ± ۰/۰۰۰۲              | ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۰۲              | ۰/۳                    | ۰/۱     |

سطوح دو miRNA شامل miR-125b-5p و miR-125a-5p به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بود. میانگین تغییر در بیان برای miR-125a-5p در گروه پلی سیتمی ورا ۶ و در گروه ترومبوسیتمی اساسی ۸ بود. (جدول ۴). در گروه پلی سیتمی ورا، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود ( $r = ۰/۵۳۱$ ،  $p = ۰/۰۱$ ). در هر دو گروه پلی سیتمی و ترومبوسیتمی اساسی، ارتباط miR-125a-5p با JAK2 V617F allele burden و miR-125a-3p معنادار نبود.

## بحث

این حقیقت که موتاسیون JAK2 V617F در بیماران با فنوتیپ MPN (Myeloproliferative Neoplasms) مختلف یافت می شود، وجود دیگر عوامل پاتوژنیک کمک کننده را بیان می کند که موجب تکثیر در رده های میلوئیدی خاص می شود. شناسایی این موتاسیون باعث ایجاد سؤالاتی شده که پاسخ به آن ها هنوز نامشخص است. اول این که چرا یک موتاسیون منفرد در چنین شیوع بالایی در اختلالات میلوئید اما نه در دیگر بدخیمی ها اتفاق می افتد؟ دوم این که چگونه یک موتاسیون منفرد با پاتوژن بیماری های مجزا از نظر فنوتیپی مرتبط است؟ و سوم این که اگر چه تقریباً همه بیماران پلی سیتمی ورا و تقریباً نیمی از بیماران ترومبوسیتمی اولیه دارای موتاسیون JAK2 هستند، چرا بیماران باقی مانده مبتلا به PV و ET، موتاسیون JAK2 قابل شناسایی ندارند؟ برای توضیح این مسأله نظرات متعددی ارایه شده است نظیر: سطوح متغیر فعالیت کیناز JAK2 (تئوری بار موتاسیون)، زمینه ژنتیکی افراد، یک فرآیند مولکولی قبل از JAK2، مکانیسم های اپی ژنتیک و

تغییر بیان miRNA (۱۷). در واقع نتایج مطالعه های اخیر نشان داده که تغییر بیان miRNAs با بدخیمی های هماتولوژیک به خصوص لوکمی مرتبط است (۱۸). هر چند که در بسیاری از لوکمی های 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 می تواند باعث افزایش حساسیت به سایتوکاین ها و در نتیجه افزایش پرولیفراسیون سلولی شود افزایش miR-125 نیز با تاثیر بر بیان تارگت های مختلف نظیر ABTB1 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain) و پروتئین های فسفاتاز نظیر PTPN18 (Containing 1 (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 18) و PPP1CA (Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit) می تواند منجر به افزایش حساسیت به سایتوکاین گردد (۲۰، ۱۹). اما نتایج این مطالعه ها، بیشتر بر پایه مطالعه های *in vivo* و از طریق دستکاری های ژنتیکی بوده و مطالعه ای که به طور سیستماتیک به بررسی بیان miR-125a در لکوسیت های 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 لکوسیت های خون محیطی بیماران PV و ET بررسی و مشخص شد که سطح بیان miR-125a-5p در هر دو گروه PV و ET افزایش می یابد ( $p = ۰/۰۰۳$ ،  $p = ۰/۰۰۲$ ). در گروه PV، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود ( $r = ۰/۵۳۱$ ،  $p = ۰/۰۱$ ). ارتباط بیان این دو میکرو RNA در هر دو گروه PV و ET با JAK2 V617F allele burden معنادار نبود.

بنابراین مشخص شد که miR-125a می تواند به عنوان یک شاخص پیشگویی کننده و یک هدف درمانی در بیماران MDS به کار رود. مطالعه های گسترده ای در مورد تغییر بیان میکرو RNA در بیماران MPN انجام گرفته و مشخص شده که بعضی از این میکرو RNA ها 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 miRNA و JAK2V617F allele burden سلول CD34<sup>+</sup> مشاهده نشد (۲۲).

اخیراً در یک مطالعه توسط ژان، افزایش بیان mir-125a-3p در سلول های CD34<sup>+</sup> خون محیطی بیماران PV گزارش شده اما در مطالعه حاضر چنین نتیجه ای حاصل نشد که این تفاوت بیان می تواند 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 سلول های CD34<sup>+</sup> 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 نئوپلاسم های میلوپرولیفراتیو (مطالعه های انجام گرفته در نمونه های اولیه بیماران)

- ❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-150، -155 و افزایش بیان miR-451) در طی تمایز اریترئیدی سلول های مونونوکلئر خون محیطی از بیماران PV در آزمایشگاه. سطوح بالاتر miR-451 در سلول های CD34<sup>+</sup> PV نسبت به کنترل های نرمال (۱۱).
- ❖ تغییر بیان MiRNA در گرانولوسیت ها، سلول های مونونوکلئر، پلاکت ها و رتیکولوسیت ها، به عنوان مثال افزایش بیان miR-143 و miR-145 در سلول های مونونوکلئر PV، کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسیت های PV (۱۰).
- ❖ افزایش بیان miR-16-2 در سلول CD34<sup>+</sup> بیماران PV. افزایش بیان miR-16-2 در سلول های CD34<sup>+</sup> نرمال، پرولیفراسیون و تمایز اریترئید را تحریک می کند، در حالی که مهار miR-16-2 در سلول های CD34<sup>+</sup> PV تشکیل کلونی اریترئید را کاهش می دهد (۲۳).
- ❖ افزایش بیان miR-575 و miR-887 و کاهش بیان miR-196B و miR-551B در سلول های CD34<sup>+</sup> خون محیطی بیماران زن و مرد PV. افزایش بیان miR-451 و miR-145 در سلول های CD34<sup>+</sup> خون محیطی بیماران PV در مقایسه با کنترل های سالم (۱۶).
- ❖ تغییر بیان MiRNA در سلول های CD34<sup>+</sup> و گرانولوسیت های خون محیطی بیماران PMF (۲۴).
- ❖ افزایش بیان miR-28 از ۳۰٪ از پلاکت های بیماران MPN (ET، PV، PMF) و ارتباط با JAK2V617F allele burden. مهار تمایز مگاکاریوسیت های سلول های CD34<sup>+</sup> انسان توسط miR-28 (۲۵).
- ❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-133A) در نوتروفیل های خون محیطی بیماران MPN (PV و ET) (۲۶).
- ❖ تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-34A) در گرانولوسیت های بیماران PV، ET و PMF در مقایسه با کنترل ها (۲۴).
- ❖ افزایش بیان miR-145 و miR-451 در سلول های کلونی PV BFU-E در مقایسه با سلول های کلونی ET BFU-E (هم JAK2V617F-positive و هم JAK2V617F-negative) (۱۶).
- ❖ کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسیت های PV که به طور معکوس با فرکانس JAK2 مرتبط است. افزایش بیان miR-182 در گرانولوسیت های PV (۱۰). ارتباط افزایش بیان miR-182 با JAK2 V617F allele burden (۲۴).
- ❖ کاهش بیان miR-342 در PV، PMF و ET (۲۴) و ارتباط معکوس با JAK2 V617F allele burden (۱۰).
- ❖ 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 سلول های 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 JAK2 در پاتوژنز 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, Theoharides 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.<sup>1</sup>, Atarodi K.<sup>1</sup>, Amirizadeh N.<sup>1</sup>, Toogeh Gh.<sup>2</sup>, Azarkeivan A.<sup>1,3</sup>,  
Shirkoochi R.<sup>4</sup>, Faranoush M.<sup>5</sup>, Vaezi M.<sup>6</sup>, Alimoghaddam K.<sup>7</sup>, Ghavamzadeh A.<sup>7</sup>,  
Ghaffari S.H.<sup>7</sup>, Timori Naghadeh H.<sup>1</sup>, Pirmohammad Jamaat Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

<sup>2</sup>School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Adult Thalassemia Clinic, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Iran University of Medical Sciences, Rasool Akram Hospital, Tehran, Iran

<sup>6</sup>Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>7</sup>Hematology, 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% ( $62.37 \pm 18.29$ ) for patients with PV and 40% ( $43.4 \pm 13.95$ ) 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