

The Effect of miR-940 Up-regulation on HbF and Erythroid Markers Expression in k-562 Cell Line

Hengamesadat Razavi¹, Shaban Alizadeh^{2*}, Amir Atashi³, Parvin Rahmani¹

1. Ms.c, Department of Hematology, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Hematology, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Hematology, Shahrood University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Received: 31 Dec 2016, Accepted: 12 Jul 2017

Abstract

Background: Fetal hemoglobin ($\alpha_2\gamma_2$) is the main oxygen transport protein in the human fetus. Fetal hemoglobin is nearly completely replaced by hemoglobin A, except in a few thalassemia cases and sickle cell anemia. Several studies have indicated that expression of γ -globin might be regulated post-transcriptionally. Small non-coding RNA called microRNAs which target mRNA can lead to translated repression or mRNA decay. The aim of this study is to investigate the effect of miR-940 up-regulation on γ -chain gene expression and erythroid markers in k562 cell line.

Materials and Methods: In this experimental study, k562 cells were cultured in RPMI1640. Then pre miR-940 was transfected by electroporation method in k562 cell line. In 3, 7 and 14 days, RNA was extracted and cDNA synthesized in selected days. Up-regulation of miR-940 was confirmed by miRNA Quantitative real time PCR and then the expression γ of chains and GATA-1 was investigated by QRT-PCR. Finally, erythroid markers were checked by flow cytometry.

Results: In 3, 7 and 14 days after transfection, the GATA-1 and γ -chain expression were increased in comparison with untransfected cells. Also, the expression of erythroid markers was increased.

Conclusion: The data show that up-regulation of miR-940 has a role in the increase of γ -chain gene expression in k-562 cell line. We suggest that miR-940 may be a significant potent therapeutic target for increasing Hb F level. Patients with sickle cell anemia and β -thalassemia are suitable candidate for treatment in this way.

Keywords: Hemoglobin, K-562, miR-940

*Corresponding Author:

Address: Department of Hematology School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: alizadeh1982@gmail.com

تأثیر تنظیم افزایشی miR-940 بر القای بیان هموگلوبین F و شاخص های رده اریتروئیدی در رده سلولی k-562

هنگامه سادات رضوی^۱، شعبان علیزاده^{۲*}، امیر آتشی^۳، پروین رحمانی^۱

۱. کارشناسی ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: هموگلوبین جنینی پروتئین اصلی انتقال دهنده اکسیژن در جنین انسان است. هموگلوبین A پس از تولد به جز در موادی از تالاسمی‌ها و آنمی داسی شکل، جایگزین هموگلوبین F می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که بیان زنجیره گاما می‌تواند در تنظیم فعالیت‌های پس از رونویسی نقش داشته باشد. میکرو آر ان ای‌ها که RNAهای کوچک غیر کد شونده نامیده می‌شوند، mRNA را مورد هدف قرار می‌دهند و می‌توانند منجر به سرکوبی مرحله ترجمه یا تخریب mRNA شوند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر miR-940 بر روی بیان زنجیره گاما هموگلوبین F و مارکرهای رده اریتروئیدی در رده سلولی k-562 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های رده k-562 در محیط RPMI1640 کشت داده شدند. سپس پیشساز ژن miR-940 به روش الکتروپوریشن وارد رده سلولی k-562 شد. در روزهای ۳، ۷ و ۱۴، RNA استخراج گردید و cDNA در روزهای انتخاب شده ساخته شد. افزایش بیان miR-940 توسط تکنیک real-time تأیید گردید و میزان بیان زنجیره‌های گاما و فاکتور GATA-1 به روش Quantitative Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. در نهایت، مارکرهای اریتروئیدی توسط فلوسایتومتری بررسی شدند.

یافته‌ها: در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ بعد از انتقال ژن به داخل رده سلولی، میزان بیان فاکتور GATA-1 و زنجیره گاما نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. هم‌چنین بیان شاخص‌های رده اریتروئیدی افزایش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: شواهد نشان می‌دهد که افزایش miR-940 در بالا رفتن بیان زنجیره گامای هموگلوبین نقش دارد. می‌توان اظهار داشت که miR-940 ممکن است یک هدف درمانی قابل ملاحظه در بالا بردن میزان Hb F باشد. مبتلایان به کم‌خونی داسی شکل و بتا-تالاسمی کاندیدهای مناسب برای این نوع درمان هستند.

واژگان کلیدی: miR-940، هموگلوبین، k-562

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی

Email: alizadeh1982@gmail.com

مقدمه

مولکول‌ها در روندهای حیاتی سلول مانند تکثیر، پیری سلول، آپوپتوز، متابولیسم و تمایز نقش دارند (۹-۱۰). تحقیقات اخیر نشان داده است که microRNA در تنظیم بیان هموگلوبین F و تعویض کلاس زنجیره گاما به بتا نقش دارند. در نتیجه هرگونه بد تنظیمی یا بیان بد آن‌ها منجر به اختلالات خونی می‌شود (۱۰، ۱۱). در سال ۲۰۱۶ طیبی و همکارانش پروفایل microRNA سلول‌های خون ساز CD133⁺ که از بند ناف جدا شده بودند و با داروی سدیم بوتیرات تیمار شده بودند، بررسی کردند. miR-940 از نظر بیان و غلظت دارای تغییرات چشم‌گیری بود. آنها متوجه شدند که miR-940 در افزایش بیان Hb F نقش به‌سزایی دارد (۱۲). هدف از انجام این مطالعه تعیین تاثیر افزایشی miR-940 بر روی Hb F از طریق آنالیز بیان ژن‌های زنجیره بتا و گاما در روزهای مختلف در رده سلولی K562 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، برای استخراج DNA از خون کامل، از کیت Genomic DNA Extraction (viogene) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. برای تکثیر قطعه pre-miR-940 دو پرایمر طراحی شد (جدول ۱). سپس با استفاده از master mix Amplicon و واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) صورت گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و باند مورد نظر رویت شد.

استخراج پلاسمید

پلاسمید مورد مطالعه p-lentiIII-miR-GFP cloning می‌باشد که با استفاده از کیت Endotoxin free Ultrapure DNA midi (viogene) طبق دستورالعمل از کشت ۱۶ ساعته باکتری STBL4 در محیط LB مایع حاوی انتی بیوتیک کانامایسین با غلظت $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ استخراج شده است.

هموگلوبین جنینی (Hb F) با دو زنجیره الفا و دو زنجیره گاما ($\alpha_2\gamma_2$)، اصلی‌ترین هموگلوبین تا زمان تولد است. در نزدیکی زمان تولد، تولید Hb F کاهش می‌یابد و هموگلوبین A ($\alpha_2\beta_2$) جایگزین می‌شود. اختلالات زنجیره بتا در هموگلوبین هم چون آنمی داسی شکل و تالاسمی بتا از دلایل اصلی مرگ و میر در جهان به‌شمار می‌آید. در این اختلالات افزایش مقدار Hb F سودمند بوده و به‌عنوان یک مکانیسم جبرانی سبب کاهش قابل ملاحظه علائم بالینی بیماران می‌شود (۵، ۸). یکی از مشکلات اصلی که بیماران بتا تالاسمی ماژور با آن روبه‌رو هستند، عدم تولید زنجیره β و به دنبال آن تجمع زنجیره α اضافی که این عمل منجر به عوارض اصلی در این بیماران می‌شود مثل کاهش اکسیژن واریتوئن غیر موثر. از طرفی در بیماران مبتلا به SCD تولید زنجیره ناقص ویا معیوب β منجر به داسی شدن گلبول‌های قرمز، انسداد عروقی و به دنبال آن عوارض مربوط به انسداد می‌شود. با این تفاسیر یکی از راه کارهای درمانی در این دسته از بیماران افزایش سطح هموگلوبین F است. افزایش سطح هموگلوبین F در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی ماژور هم باعث جبران کاهش اکسیژن رسانی و هم از طرفی عوارض ناشی از تجمع زنجیره α اضافی را کاهش می‌دهد. در بیماران مبتلا به SCD این افزایش مانع از داسی شدن سلول و متعاقب آن کاهش عوارض مرتبط با داسی شدن می‌شود. برای افزایش هموگلوبین F چندین راه کار درمانی وجود دارد. یکی از این راه کارهای درمانی استفاده از داروهایی است که بر پایه اپی ژنتیک کار می‌کنند و البته عوارض جانبی بسیار زیادی برای بیماران به همراه دارد. با توجه به اثرات نامطلوب داروها در افزایش هموگلوبین F راه کار درمانی جدیدی برای افزایش HbF مشخص شده که شامل اهداف ملکولی برای القاء هموگلوبین F است (۱-۴).

microRNA مولکول‌های تک رشته‌ای کوچک و غیر کدکننده هستند که از ۲۴-۱۸ نوکلئوتید ساخته شده‌اند. این ریز

مرحله هضم و اتصال

پلاسمید و قطعه pre-miR-940 به طور جداگانه مورد هضم دو آنزیم محدود کننده EcoRI و XhoI (به صورت double digest) در حضور بافر Tango10x طبق پروتکل کیت Thermo scientific قرار گرفتند. برای کلون کردن ژن pre-miR-940 در داخل پلاسمید از آنزیم (TAKARA) T4DNA ligase استفاده شد.

کشت سلول

در این مطالعه، سلول‌های K562 (رده سلولی CML) به صورت سوسپانسیون در محیط RPMI1640glutamax (Gibco) ، FBS10% ، (Gibco) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ و استرپتومایسین $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و فشار $5\% \text{CO}_2$ کشت داده شدند. سلول‌های K562 از بانک سلولی مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری شد.

انتقال کلون سنتز شده به داخل سلول

برای انتقال پلاسمید حاوی ژن مورد نظر از روش فیزیکی الکتروپوریشن کمک گرفته شد با استفاده از کیت Nucleofector kits for cell line (Lonza) ترانسفورماسیون صورت گرفت. الکتروپوریشن تنها یک بار صورت گرفت و سلول‌ها هر ۶ ساعت زیر میکروسکوپ فلورسنت فاز معکوس از لحاظ مرفولوژی و زنده ماندن به مدت ۴۸ ساعت بررسی شدند. پس از گذشت ۳ روز از انتقال و کتور به داخل سلول استخراج RNA در روزهای انتخاب شده آغاز گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای استخراج RNA از سلول‌های K562 از کیت High pure RNA Isolation (Invitrogen) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. متعاقب گذشت زمان‌های ۳، ۷ و ۱۴ روز بعد از انتقال ژن به رده سلولی، RNA سلول‌ها استخراج شده و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Thermo Nano drop اندازه گیری شد. سپس

برای هر RNA استخراج شده به طور جداگانه در روز مورد نظر cDNA ساخته شد. برای سنتز cDNA (واکنش رونویسی معکوس) از Prime Script RT reagent kit (TAKARA) استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۱۰ میکرولیتر بوده و محتویات آن شامل ۲ میکرولیتر بافر 5x ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ، ۰/۵ میکرولیتر رندوم هگزامر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase (20U/ml)، ۱ میکروگرم از RNA مورد آزمایش به ازای هر واکنش می‌باشد. محتوی مذکور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای 85°C درجه انکوبه شدند. cDNA سنتز شده در دمای 20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سنتز cDNA ژن pre-miR-940 از کیت اختصاصی miRNA 1 strand cDNA synthesis kit (Agilent) استفاده شد و خلوص آن توسط دستگاه Nano drop تایید شد.

ارزیابی کمی بیان ژن‌های زنجیره آلفا، بتا و گاما

آزمون Real time PCR در دستگاه Light cycler (Bioer) و در حجم $20 \mu\text{l}$ انجام شد. ابتدا پرایمرهای با غلظت ۵۰ نانو مول تهیه شده است. به ازای هر واکنش $10 \mu\text{l}$ از SYBR premix Taq (TAKARA) ، $0.5 \mu\text{l}$ از هر پرایمر، $2 \mu\text{l}$ از محصول cDNA و $7 \mu\text{l}$ آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل برای واسرشتی در دمای 95°C به مدت ۵ ثانیه، مرحله اتصال و بازآرایی در دمای 60°C به مدت ۲۰ ثانیه می‌باشد. ارزیابی کمی ژن Pre-miR-940 با استفاده از کیت 5X Hot FIREPOL Eva (Solis Bio Dyne) طبق دستورالعمل انجام شد. نمودار منحنی ذوب: قبل از آنالیز داده‌ها منحنی ذوب جهت هر ژن به دست آمد و با بررسی این منحنی‌ها صحت پیکم مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید گردید. محاسبه efficiency با روش شیب خط در نمودار: جهت بررسی بازده واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این

ژن رفرانس (GAPDH) و چند ژن هدف وجود دارد. یک گروه (گروه کنترل) به عنوان کالیبراتور شناخته می شود و بیان ژن ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می شود. تمام ارزیابی های کمی ژن ها ۳ بار تکرار شدند. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش Real time در جدول ۱ آورده شده است. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری spss نسخه 20 استفاده شد.

کار رقت های متفاوت از یک cDNA تهیه کرده، سپس برای آن ها تست Real-time PCR انجام داده و از Ct های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده گردید (نمودار ۱). بعد از تهیه نمودار استاندارد به وسیله فرمول زیر بازدهی واکنش Real-time PCR محاسبه گردید.

$$Efficiency = 10^{[-1/slope]}$$

محاسبه بیان ژن ها بر اساس فرمول ($-\Delta\Delta Ct$) که نسبت بیان ژن هدف را به ژن رفرانس محاسبه می کند. در این بررسی یک

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در واکنش ها

gene	Primer sequence
Pre miR-940	Forward : 5' GAATTCCTCTTAGGGCCTTGGGTTTG 3' Reverse : 5' CTCGAGGTCACCTTAGGCTGCTCAT 3'
γ -chain	Forward: 5' GGAGGACAAGGCTACTATCA 3' Reverse: 5' GAATTCCTTTGCCGAAATGGA 3'
B-chain	Forward: 5' CCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAC 3' Reverse: 5' CCAGCACACAGACCAGCACG 3'
GATA-1	Forward: 5' AGACGACCACCACGACAC 3' Reverse: 5' CAGATGCCTTGCGGTTTC 3'
GAPDH	Forward: 5' GCTGAGTACGTCGTGGAGTC 3' Reverse: 5' GCAGGAGGCATTGCTGATG 3'

فلوسیتومتری

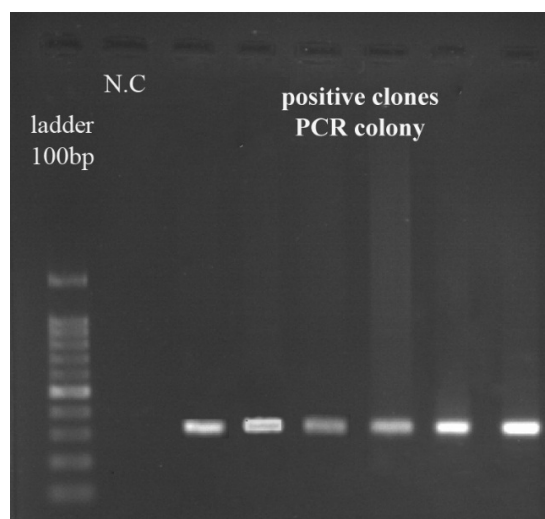
سلول شمارش شد و با PBS شستشو داده شدند. سپس 100 μ l از 3% BSA و 10 μ l آنتی بادی اولیه (Iso antibody, anti-CD235) به آن ها اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال انکوبه گردید. دوباره با 1 ml از محلول PBS سرد شستشو داده و در 100 μ l از 3% BSA معلق شدند. سپس 2 μ l آنتی بادی ثانویه اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال انکوبه گردید. سپس در دستگاه قرائت شد.

فاز نهایی کار، بررسی تمایز سلول ها از لحاظ شاخص های سطحی که با تکنیک فلوسیتومتری انجام شد. جهت بررسی بیان سطحی CD71 و CD235a از آنتی بادی اولیه غیرنشاندار که با آنتی بادی ثانویه نشاندار با FITC شناسایی می گردد، استفاده شد. هر دو آنتی بادی ها از شرکت Exbio (Czech Republic) خریداری شد. ابتدا 10^5

یافته‌ها

نتیجه مربوط به Colony PCR به منظور انتخاب کلنی‌های مثبت پس از انجام واکنش Ligation و انتقال پلاسمیدهای نو ترکیب به درون باکتری، باکتری‌های حاصل در پلیت حاوی کانامایسین کشت داده شده و پس از رشد کلونی‌ها چند ده مورد از آن‌ها

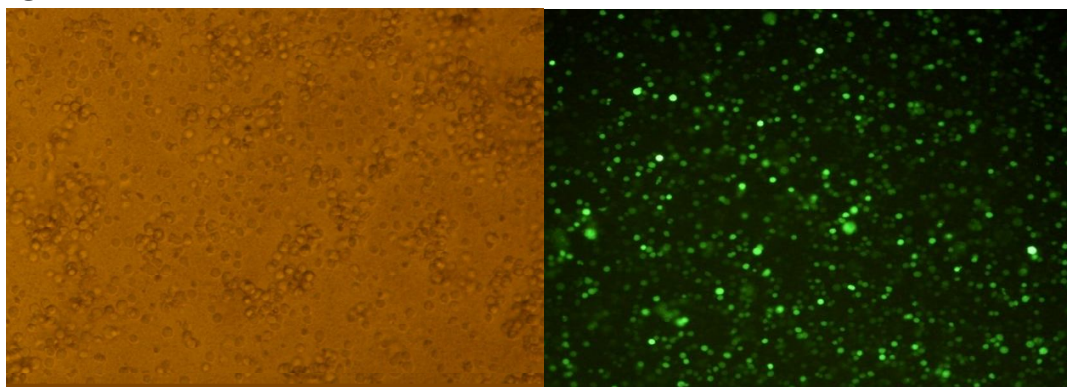
انتخاب گردیده و پس از استخراج پلاسمید واکنش PCR با پرایمرهای مشابه تکثیر قطعه بر روی آن‌ها انجام گرفت تا صرفاً پلاسمیدهایی برای مراحل بعدی انتخاب گردد که دارای قطعه مورد نظر باشند نمونه‌ای از محصول واکنش در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. الکتروفورز محصول colony PCR مربوط به miR-940

آلودگی سلول K-562 با پلاسمید حاوی ژن miR940

سلول‌های مورد نظر بعد از آلودگی با پلاسمید در زیر میکروسکوپ معکوس فلورسانس، رنگ سبز براق از خود ساطع می‌کند. (شکل ۲)

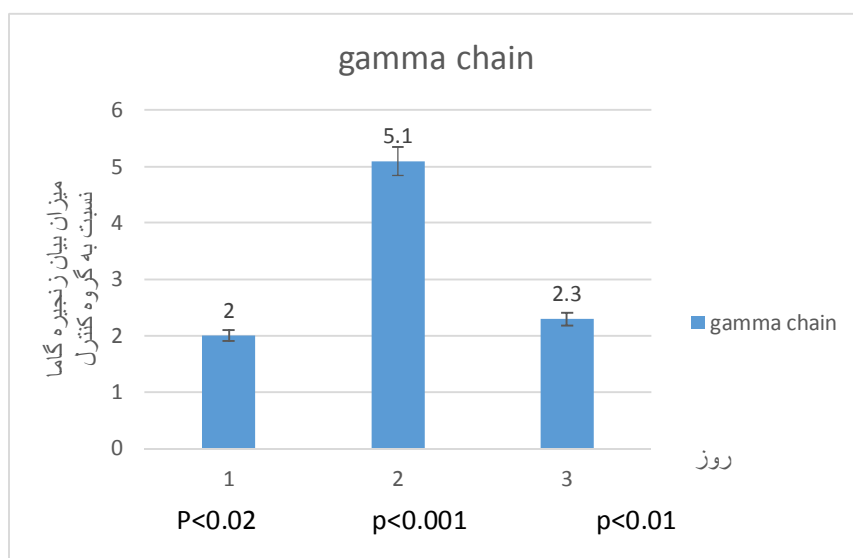


شکل ۲. سلول k-562 بعد از انتقال پلاسمید زیر میکروسکوپ فلورسانس با بزرگ‌نمایی 40X (راست) سلول‌های k-562 بعد از ترانسفکشن زیر میکروسکوپ نوری 40X (چپ)

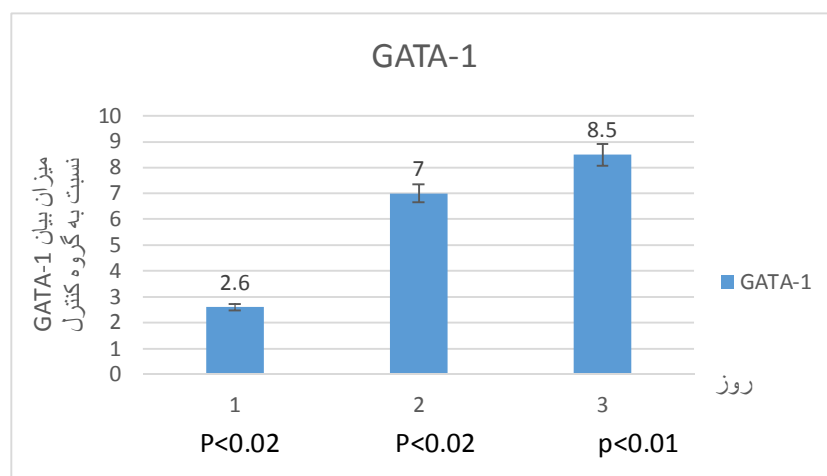
cdNA انجام شد. به دلیل بیان زنجیره های هموگلوبین و هم چنین فاکتور GATA1 توسط سلول های K562 با روش RT-PCR نمی توان تاثیرات افزایشی یا کاهششی ناشی از miRNA را مشاهده کرد. به همین منظور با مطالعه ای که روی زنجیره های مختلف هموگلوبین با روش Real Time PCR انجام شد، بیان زنجیره ی گاما و فاکتور GATA-1 افزایش قابل توجهی داشت (شکل ۳ نمودارهای الف و ب و ج).

ارزیابی تاثیر افزایشی miR-940 بر سلول K-562
جهت اطمینان از عملکرد کلون ساخته شده و بررسی پروفایل کلون سنتز شده در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ با کیت Stratagen واکنش Real Time PCR انجام شد و بیان miR-940 نسبت به نمونه کنترل بررسی شد که به ترتیب حدود ۲، ۴، ۶، ۹ و ۴، ۱۹ برابر شده بود.

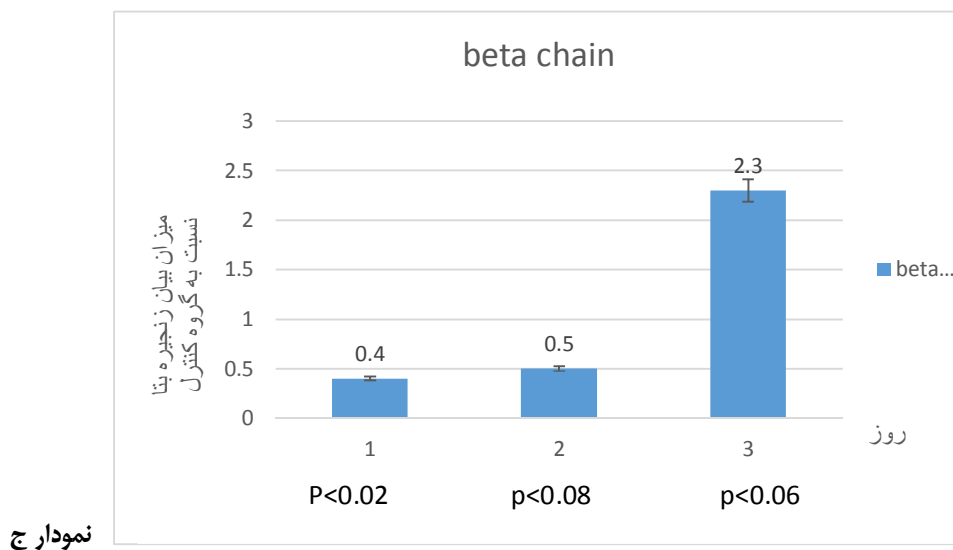
تغییرات بیان زنجیره های گاما، بتا و GATA-1
پس از انتقال کلون به رده سلولی K562 در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ جداسازی RNA از نمونه ها صورت گرفت و سپس سنتز



نمودار الف



نمودار ب



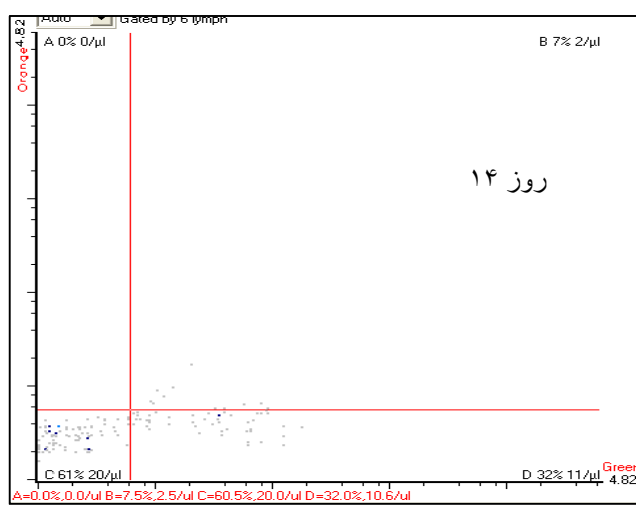
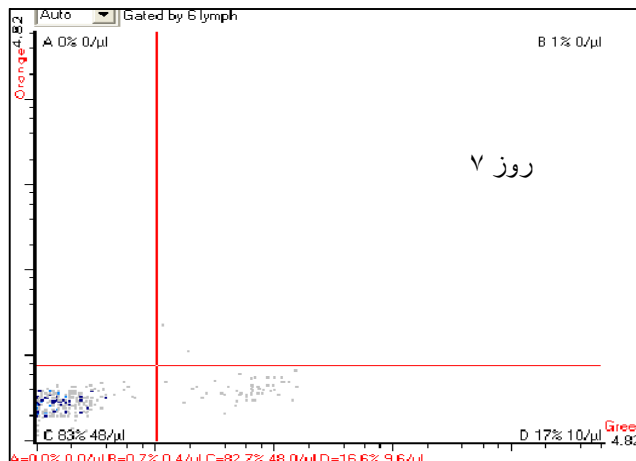
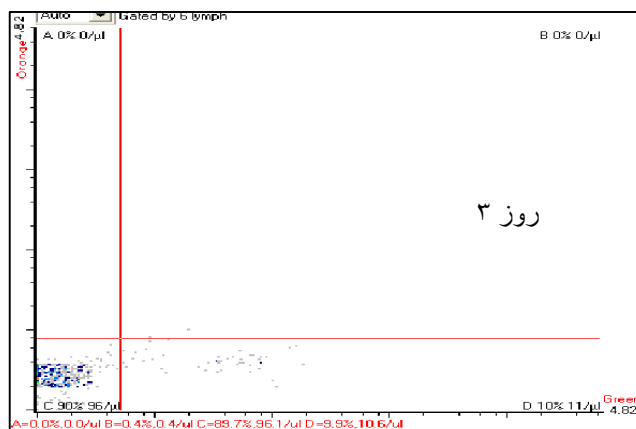
نمودار ج

شکل ۳. تأثیر miR-940 بر روی زنجیره های گاما (نمودار ب) و بتا هموگلوبین (نمودار ج) و فاکتور GATA-1 (نمودار الف) در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از انتقال ژن هدف به داخل سلول k-562

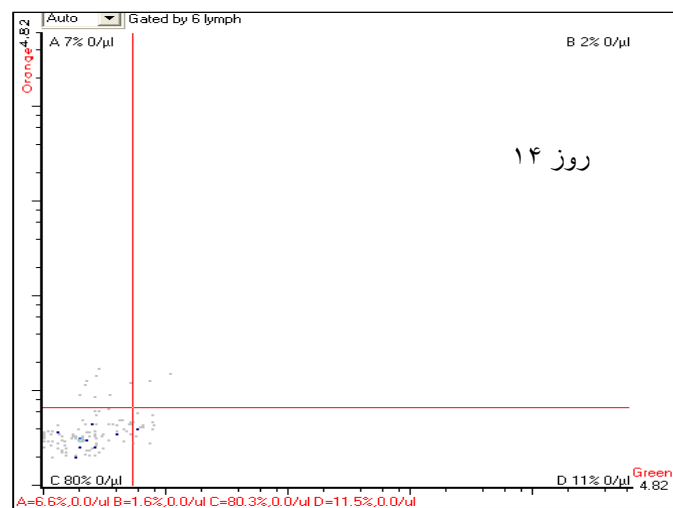
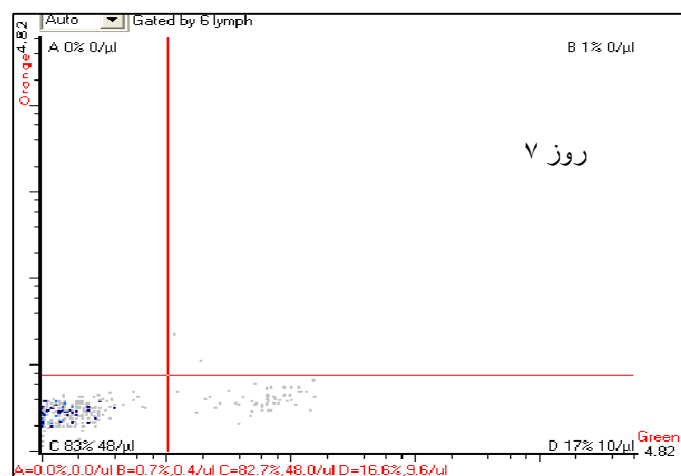
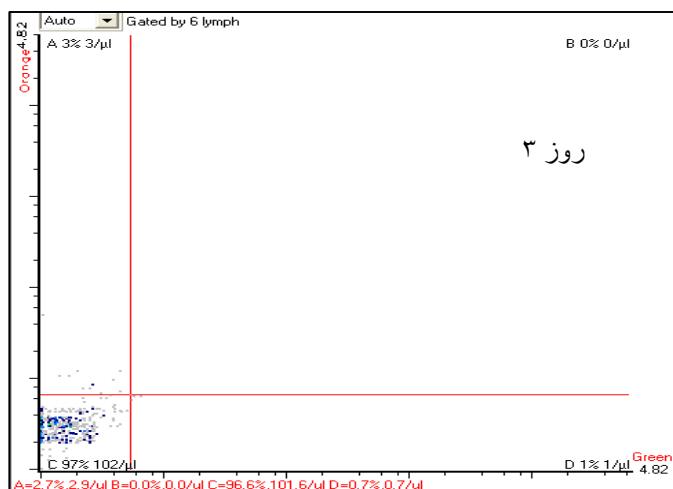
نتایج فلوسیتومتری

و CD235a) آنالیز شد و با سلول های کنترل مقایسه گردید. بیان مارکر CD71 و CD235a در روز سوم و هفتم و چهاردهم در زیر نشان داده شده است (شکل ۴-۵).

نمونه های روزهای سوم و هفتم و چهاردهم تیمار شده با پلاسمید حاوی ژن miR-940 و نمونه کنترل فلوسیتومتری انجام گردید و نتایج جهت بیان مارکرهای اریترئیدی (CD71



شکل ۴. نتایج فلوسیتومتری مارکر CD71 به ترتیب از بالا به پایین در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از انتقال پلاسמיד



شکل ۵. نتایج فلوسیتومتری مارکر CD235a به ترتیب از بالا به پایین در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از انتقال پلاسمید

بحث

اختلالات زنجیره β -گلوبین نظیر SCA و β -تالاسمی، شایع ترین عامل بیماری های ژنتیکی در دنیا و یکی از مهم ترین عامل مرگ و میر به حساب می آیند (۵-۶). نشان داده شده است که سطوح بالای هموگلوبین جنینی (Hb F) در این اختلالات باعث کاهش شدت عوارض کلینیکی و کاهش قابل توجه در مرگ و میر می شود. در حال حاضر رایج ترین درمان این بیماران القاگرهای هموگلوبین F می باشد که به واسطه داروهای مختلفی انجام می شود که خود این داروها در دراز مدت دارای عوارض سایتوتوکسیک می باشند (۱۳). بر این اساس مسیرهای درمانی جدیدی برای القاء هموگلوبین F مورد توجه قرار گرفته است که براساس هدف قرار دادن ملکول هایی است که در تنظیم بیان هموگلوبین F و جابه جایی یا (تعویض کلاس) آن به زنجیره بتا-گلوبین نقش دارند و هم چنین ملکول هایی که در مکانیسم های تنظیمی به واسطه ی داروها نقش دارند. یکی از این ملکول ها RNA های ریز یا miRNAs هستند که به عنوان یک هدف ملکولی جدید برای القاء بیان هموگلوبین مورد توجه قرار گرفته اند. سلول های K-562 مورد مطالعه به دو گروه کنترل و تست با شمارش سلولی یکسان تقسیم شدند و گروه تست با پلاسمید حاوی miR-940 تیمار شدند. سلول های هر دو گروه در روزهای سوم و هفتم و چهاردهم از نظر افزایش بیان هموگلوبین با تکنیک Real Time-PCR، شاخص های اریتروئیدی به وسیله فلوسیتومتری مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. با توجه به این که سلول K-562 به طور اولیه بیان ضعیف از هموگلوبین ها را نشان می دهد، باید میزان بیان این هموگلوبین ها با گروه کنترل مقایسه می شد. ابتدا بیان pre-miR-940 در سلول های هر دو گروه تست و کنترل، ارزیابی شد که میزان بیان آن در گروه تست نسبت به کنترل در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ به ترتیب ۲، ۴، ۶، ۹ و ۴، ۱۹ برابر شده بود که عملکردی بودن و کتور کلون شده را نیز تایید می کند.

نتایج بیان زنجیره گاما بدین صورت بود که یک افزایش بیان در روزهای ۳ و ۷ نسبت به نمونه کنترل مشاهده گردید. که این افزایش از لحاظ آماری معنی دار بوده ($P < 0.05$). اما در روز ۱۴ یک کاهش در بیان زنجیره گاما نسبت به دو زمان قبلی مشاهده گردید. در واقع به دلایلی miR بیان آن را سرکوب کرد. البته با توجه به نتایج بالا می توان گفت که در مراحل اولیه اریتروپوئز و تمایز، به طور نرمال بیان زنجیره گاما بالا است اما در مراحل انتهایی که تغییر زنجیره از گاما به بتا صورت می گیرد بیان آن کاهش پیدا می کند که تا حدودی با این نتایج ما هم خوانی دارد. هم چنین در مورد بیان فاکتور GATA-1، در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ یک افزایش بیان مشاهده شد. البته در روزهای ابتدایی کم و در انتها افزایش زیاد مشاهده شد. که این افزایش خطی و از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). به طور کلی GATA-1 فاکتور اصلی در اریتروپوئز نرمال و بلوغ اریتروئیدی می باشد که در تمایز نهایی و در مراحل انتهایی به طور کلی افزایش می یابد و هم چنین در تعویض کلاس زنجیره گاما به بتا نقش دارد (۱۴). شاید به همین علت در ابتدا بیان آن پائین و هر چه به روزهای ۱۴ و بلوغ نهایی نزدیک شدیم بیان آن افزایش پیدا کرد که البته در این مرحله هم چنین افزایش آن و کاهش بیان زنجیره گاما می تواند توجیهی برای تعویض کلاس باشد. در مورد زنجیره بتا در روزهای ذکر شده افزایش قابل توجه و معنی داری از لحاظ آماری نداشت البته نسبت به نمونه کنترل کمی افزایش داشت. در مرحله بعد نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای اختصاصی رده اریتروئیدی CD71 و CD235a (GPA) بررسی شدند. شاخص های مذکور افزایش چشم گیری در گروه تست نسبت به گروه کنترل نشان دادند. در روز ۳ میزان $CD71=10\%$ و $CD235a=3\%$ در روز ۷ میزان $CD71=29\%$ و $CD235a=11\%$ و در روز ۱۴ میزان $CD71=32\%$ و $CD235a=25\%$ بود.

CD71 به عنوان گیرنده ترانسفرین و CD235a به عنوان دو مارکر اصلی در تمایز اریتروئیدی می باشند که در طول

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۲۹۴۲۴ مورخ ۱۳۹۴/۴/۱۰ می باشد.

منابع

1. Baure DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr* 2011;23(1): 1-8
2. Sankaram VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb perspect Med* 2013;3(1)a0011643.
3. Maton, Anthea; Jean Hopkins; Charles William McLaughlin; Susan Johnson; Maryanna Quon Warner; David LaHart; Jill D. Wright (1993). *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall. ISBN 0-13-981176-1.
4. Dominguez de Villota ED, Ruiz Carmona MT, Rubio JJ, de Andrés S (1981). "Equality of the in vivo and in vitro oxygen-binding capacity of haemoglobin in patients with severe respiratory disease". *Br J Anaesth*. 53 (12): 1325-8
5. Weatherall DJ. *Thalassaemias*: Wiley Online Library; 2010
6. Rees, DC; Williams, TN; Gladwin, MT (11 December 2010). "Sickle-cell disease.". *Lancet (London, England)*. 376 (9757): 2018-31
7. Walker AL, Steward S, Howard TA, Mortier N, Smeltzer M, Wang Y-D, et al. Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118(20):5664-70
8. Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhi F, Dunda-Belkhdja O, Chardin P, et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(7):2111-2114.

اریتروپوئز نرمال بیان آنها افزایش پیدا می کند. با توجه به نتایج فوق و نتایج مربوط به بیان miR-940 در روزهای ذکر شده می توان گفت که در طول تمایز با افزایش بیان miR-940 بیان این دو مارکر هم یک افزایش خطی و معنی دار داشته که اشاره به نقش miR-940 در تمایز اریتروئیدی دارد. در مورد نقش miR-940 در تمایز به سمت رده اریتروئیدی، هنوز به خوبی مشخص نشده که چه ژنهایی به طور مستقیم مورد هدف miR-940 قرار می گیرند که نهایت باعث این تمایز می شود. اما می توان احتمالاتی داد. یکی از این ژنهای هدف TPO می باشد. TPO به عنوان یک فاکتور رشد اصلی مگاکاریوسیتی می باشد که در تمایز به سمت این رده نقش دارد (۱۶-۱۵). از طرفی با توجه به اینکه رده های اریتروئیدی و مگاکاریوسیتی پیشساز مشترکی دارند این احتمال وجود دارد که miR-940 با سرکوب بیان این فاکتور باعث تمایز به سمت رده اریتروئیدی شود. در مطالعه ای که علیزاده و همکارانش در راستای القای تمایز انجام دادند نشان داده شد که تفکر القای تمایز با استفاده از microRNA می تواند به تنهایی جواب گو باشد (۱۷).

نتیجه گیری

توانایی miRNA ها در القاء تمایز به سمت یک رده خاص و یا توانایی آن ها در بیان ژنهای خاصی مانند ژنهای هموگلوبین ها نقش بالقوه آنها را در ژن درمانی یاد آور می سازد. ناگفته پیداست که بیماری های ناشی از اختلال در گلوبول های قرمز دسته عظیمی از بیماری های انسان را به خود اختصاص داده است که درصد عظیمی از آنها تنها ناشی از یک جهش یا بد تنظیمی است. miRNA ها با توجه به هدف قرار دادن ژنهای متعدد کاندید خوبی در این زمینه هستند. شاید در آینده بشر بتواند با مطالعات تکمیلی و دقیق از این مولکول های کوچک و توانمند در پزشکی و مهندسی بافت به شایسته ترین نحو بهره برد.

9. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one*. 2008;3(11):e3694
10. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205
11. Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Rep*. 2009;42(8):493-9
12. Tayebi B, Abrishami F, Alizadeh sh, Minayi N, mohammadian M, Soleimani M, et al. Modulation of microRNAs expression in hematopoietic stem cells treated with sodium butyrate in inducing fetal hemoglobin expression. *Artificial cells, Nanomedicine, and biotechnology* 2016 Feb; 45(1): 146-156
13. Dehghanifard A, Hosseini SA, Shahjahani M, Salari F, Jaseb K. Evaluation of novel fetal hemoglobin inducer drugs in treatment of beta-hemoglobinopathy disorders. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2013; 7(3): 47-54.
14. Crispino JD. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. seminar in cell and developmental biology. 2005 Feb; 16 (1): 137-47
15. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors". *N. Engl. J. Med*. 354 (19): 2034-45
16. Hitchcock IS, Kaushansky K. "Thrombopoietin from beginning to end". *Br. J. Haematol*. 165 (2): 259-68
17. Kouhkan F, Hafizi M, Mobarra N, Mossahebi-Mohammadi M, Mohammadi S, Behmanesh M, Soufi Zomorrod M, Alizadeh S, Lahmy R, Daliri M, Soleimani M (2014) miRNAs: a new method for erythroid differentiation of hematopoietic stem cells without the presence of growth factors. *Appl Biochem Biotechnol* 172:2055-69