Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۳ پاییز ۹۵ (۲۲۳-۲۱۵)

مقاله پژوهشی

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

شیرین فردوسی[۱]، کامران عطاردی[۲]، ناصر امیری‌زاده[۳]، غلامرضا توگه[۴]، آزیتا آذرکیوان[۵]، رضا شیرکوهی[۶]، محمد فرانوش[۷]، محمد واعظی[۸]، کامران علی مقدم[۹]، اردشیر قوام‌زاده[۹]، سید حمیداله غفاری[۱۰]، حسین تیموری نقده[۱۱]، زینب پیرمحمد جماعت[۱]

چکیده

سابقه 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 نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو 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 و نیز سطح بیان miR-125a-5p و miR-125a-3p در لکوسیت‌های خون محیطی بیماران با روش quantitative real-time polymerase chain reaction بررسی شد. داده‌های مربوط به بیماران وارد SPSS۱۶ شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش من‌ویتنی 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= ۰/۰۰۳ ، p= ۰/۰۰۲). در گروه PV ، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود(r= ۰/۵۳۱ ، p= ۰/۰۱). درصد کمی موتاسیون JAK2 در پلی سیتمی ورا (۱۸/۲۹٪ ± ۶۲/۳۷٪) ۶۶٪ و در ترومبوسیتمی اساسی(۱۳/۹۵٪ ± ۴۳/۴٪) ۴۰٪ دیده شد (p= ۰/۰۰۷).

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، پلی‌سیتمی‌ورا، ترومبوسیتمی اساسی**

تاریخ دریافت : ۹۴/۱/۲۵
تاریخ پذیرش : ۹۴/۶/۱۷

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پلی‌سیتمی‌ورا (PV) ، ترومبوسیتمی اساسی(ET) و میلوفیبروز اولیه(PMF) که مجموعاً تحت عنوان نئوپلاسم‌های 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 JAK2 در تقریباً ۹۰–۷۵ درصد بیماران PV و در ۵۰–۳۰ درصد بیماران ET و PMF گزارش شده است(۳–۱). شناسایی این موتاسیون در همه زیر گروه‌های 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 می‌کند که موتاسیون JAK2 تنها عامل بیماری‌زای نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو نیست. بنابراین به دلیل ماهیت غیر اختصاصی موتاسیون JAK2 V617F ، شناسایی بیومارکرهای جدید می‌تواند در درک بیماری‌زایی و افتراق این گروه از بیماری‌ها کمک‌کننده باشد. اخیراً مشخص شده که میکرو RNA ها از جمله خانواده miR-125 در شروع و پیشرفت تعدادی از سرطان‌ها دخالت دارند(۸–۴). میکرو RNA ها، مولکول‌های RNA کوچک و تک رشته‌ای هستند که مکمل بخش 3' 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 گرانولوسیت‌ها، پلاکت‌ها و رتیکولوسیت‌های خون محیطی گزارش شده است(۱۱، ۱۰). با این وجود، نحوه بیان miR-125a در MPN و نیز 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 نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (پلی‌سیتمی‌ورا و ترومبوسیتمی اساسی) بررسی شد تا ارتباط آن با پارامترهای هماتولوژیک و نیز درصد کمی موتاسیون JAK2 مشخص شود. زیرا شناسایی بیان نابه‌جای یک میکرو RNA اختصاصی می‌تواند در درک 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 نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مراجعه‌کننده 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) بود(۱۲). داده‌های مربوط به بیماران وارد SPSS ۱۶ 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 آزما، ایران) انجام گرفت. جهت تعیین موتاسیون JAK2V617F از روش ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reation) استفاده شد(۱۳). برای تعیین *JAK2* V617F allele burden در نمونه‌های دارای موتاسیون، کیت تشخیصی RS-JAK2V617F Q Real Quality (ایتالیا، AB analitica) 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 غلظت مشخص(copies/µL ۲۰۰۰۰ ، 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 Real-time ۶۰۰۰ Rotor-Gene (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

www.SID.ir

Archive of SID

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 ترایزول انجام گرفت. به طور خلاصه، به سلول‌های مورد نظر ۱۰۰۰- ۸۰۰ میکرو لیتر محلول ترایزول اضافه و به آرامی محتویات تیوب چندین بار پیپت شد تا سلول‌ها در ترایزول 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 میکرولیتر 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 rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ دو فاز تشکیل گردید. فاز رویی 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. مایع‌رویی توسط سمپلر جدا و به رسوب ته تیوب ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. تیوب به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و رسوب باقی‌مانده در تیوب در۵۰-۳۰ میکرولیتر 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 Poly A Polymerase که این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و مرحله دوم شامل ساخت رشته اول c DNA 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 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 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	
ماده	**غلظت نهایی در محیط**
Poly A polymerase buffer	۲ µL
ATP (۱۰ mM)	۱ µL
Poly A enzyme	۰/۵ µL
RNA	۲۰۰ ng
Total volume (by DEPC water)	۲۰ µL
مواد و مقادیر استفاده شده در مرحله دوم ساخت cDNA از miRNA	
ماده	**غلظت نهایی در محیط**
۵ x reaction buffer	۲ µL
dNTP mix(۱۰ mM)	۱ µL
RT enzyme	۰/۵ µL
Mir cDNA syn specific primer (۱۵ pmol)	۰/۵ µL
RNA poly tail	۵ µL
Total Volume	۱۰ µL

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

www.SID.ir

Archive of SID

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(۱۶-۱۴). پس از انجام واکنش‌های PCR ، تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $^{-\Delta\Delta ct}$۲ 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 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 (۱۸/۲۹٪ ± ۶۲/۳۷٪) ۶۶٪ و در گروه ترومبوسیتمی اساسی(۱۳/۹۵٪ ± ۴۳/۴٪) ۴۰٪ دیده شد(p= ۰/۰۰۷).

در گروه پلی سیتمی‌ورا ، 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= ۰/۰۰۴) اما با شمارش پلاکت و هموگلوبین معنادار نبود.

جدول ۲ : ویژگی‌های 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 یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی

بیماران		تعداد (٪)	زن/ مرد	سن (متوسط)	اسپلنومگالی دارد/ندارد	WBC $\times 10^9$/L متوسط (range)		Hb (g/dL) متوسط (range)		Plt $\times 10^9$/L median (range)	
پلی‌سیتمی‌ورا	JAKK2V617	۱۸ (۹۰)	۸/۱۰	۴۸	۶/۱۲	۱۱ (۷/۴-۱۶/۹)	p= ۰/۱	۱۹/۲ (۱۳-۲۱)	p= ۰/۱	۳۷۸ (۱۰۴-۷۰۰)	p= ۰/۱
	JAK2 Wild-type	۲ (۱۰)	۱/۱	۳۰	۲/۰	۷/۴ (۵/۸-۱۵)		۱۸ (۱۵/۶-۲۲)		۲۲۰ (۱۳۷-۳۲۴)	
ترومبوسیتوپنی اساسی	JAKK2V617	۱۵ (۷۵)	۶/۹	۵۹	۰/۱۵	۱۰ (۸/۵-۱۱/۴)	p= ۰/۰۰۴	۱۴ (۱۳-۱۶)	p= ۰/۰۱	۷۸۲ (۵۸۳-۱۰۴۷)	p= ۰/۲
	JAK2 Wild-type	۵ (۲۵)	۴/۱	۵۵	۰/۵	۶/۵ (۲/۳-۱۲/۳)		۱۳ (۱۱-۱۵/۵)		۹۰۷ (۶۰۰-۱۰۶۷)	

www.SID.ir

Archive of SID

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)

میکرو RNA مورد بررسی	بیماران (n= ۲۰) Mean ± SD	کنترل (n = ۱۰) Mean ± SD	میانگین Fold change	p-value
MiR-125a-5P (بیماران پلی‌سیتمی‌ورا)	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 پلی‌سیتمی‌ورا)	۰/۰۰۰۶ ± ۰//۰۰۱	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 پلی‌سیتمی‌ورا ۶ و در گروه ترومبوسیتمی اساسی ۸ بود. (جدول ۴). در گروه پلی‌سیتمی‌ورا، ارتباط بین miR-125a-5p و شمارش پلاکت معنادار بود(r = ۰/۵۳۱ ، p= ۰/۰۱). در هر دو گروه پلی‌سیتمی و تروسیتوپنی اساسی، ارتباط JAK2 V617F allele burden با miR-125a-5p و miR-125a-3p معنادار نبود.

بحث

این حقیقت که موتاسیون JAK2 V617F در بیماران با فنوتیپ MPN (Myeloproliferative Neoplasms) مختلف یافت می‌شود، وجود دیگر عوامل پاتوژنیک کمک‌کننده را بیان می‌کند که موجب تکثیر در رده‌های میلوئیدی 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 میلوئید اما نه در دیگر بدخیمی‌ها اتفاق می‌افتد؟ دوم این که چگونه یک موتاسیون منفرد با پاتوژنز بیماری‌های مجزا از نظر فنوتیپی مرتبط است؟ و سوم این که اگر چه تقریباً همه بیماران پلی‌سیتمی‌ورا 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 مسأله نظرات متعددی ارایه شده است نظیر: سطوح متغیر فعالیت کیناز JAK2 (تئوری بار موتاسیون)، زمینه ژنتیکی افراد، یک فرآیند مولکولی قبل از JAK2 ، مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک و 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 میکروRNA 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 نظیر ABTB1 (ankyrin repeat and BTB (POZ) domain Containing 1) و پروتئین‌های فسفاتاز نظیر PTPN18 (Protein Tyrosine Phosplatase, Non-Receptor Type 18) و PPP1CA (Protein Phosphatase 1 Calalytic Subunit Alpha) می‌تواند منجر به افزایش حساسیت به سایتوکاین گردد(۲۰، ۱۹). 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 می‌یابد(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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 $CD34^+$ مغز استخوان بیماران MDS ، افزایش بیان دارد و بیان miR-125a به طور معکوس با بقاء بیماران مرتبط بود(۲۱).

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 miRNA و JAK2V617F allele burden سلول $CD34^+$ مشاهده نشد(۲۲).

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

- تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-150, -155 و افزایش بیان miR-451) در طی تمایز اریتروئیدی سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی از بیماران PV در آزمایشگاه. سطوح بالاتر miR-451 در سلول‌های PV $CD34^+$ نسبت به کنترل‌های نرمال(۱۱).
- تغییر بیان MiRNA در گرانولوسیت‌ها، سلول‌های مونونوکلئر، پلاکت‌ها و رتیکولوسیت‌ها، به عنوان مثال افزایش بیان miR-143 و miR-145 در سلول‌های مونونوکلئر PV ، کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسیت‌هایPV (۱۰).
- افزایش بیان miR-16-2 در سلول $CD34^+$ بیماران PV . افزایش بیان miR-16-2 در سلول‌های $CD34^+$ نرمال ، پرولیفراسیون و تمایز اریتروئید را تحریک می‌کند، در حالی که مهار miR-16-2 در سلول‌های PV $CD34^+$ تشکیل کلونی اریتروئید را کاهش می‌دهد(۲۳).
- افزایش بیان miR-575 و miR-887 و کاهش بیان miR-196B و miR-551B در سلول‌های $CD34^+$ خون محیطی بیماران زن و مرد PV . افزایش بیان miR-451 و miR-145 در سلول‌های $CD34^+$ خون محیطی بیماران PV در مقایسه با کنترل‌های سالم(۱۶).
- تغییر بیان MiRNA در سلول‌های $CD34^+$ و گرانولوسیت‌های خون محیطی بیماران PMF (۲۴).
- افزایش بیان miR-28 در۳۰٪ از پلاکت‌های بیماران MPN (ET ، PV ، PMF) و ارتباط با JAK2V617F allele burden. مهار تمایز مگاکاریوسیت‌های سلول‌های $CD34^+$ انسان توسط miR-28 (۲۵).
- تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-133A) در نوتروفیل‌های خون محیطی بیماران MPN (PV 4 و ET 2) (۲۶).
- تغییر بیان MiRNA (به عنوان مثال کاهش بیان miR-34A) در گرانولوسیت‌های بیماران PV, ET و PMF در مقایسه با کنترل‌ها (۲۴).
- افزایش بیان miR-145 وmiR-451 در سلول‌های کلونی PV BFU-E در مقایسه با سلول‌های کلونی ET BFU-E (هم JAK2V617F-positive و هم JAK2V617F-negative)(۱۶).
- کاهش بیان miR-150 در رتیکولوسیت‌های PV که به طور معکوس با فرکانس JAK2 مرتبط است. افزایش بیان miR-182 در گرانولوسیت‌های PV (۱۰). ارتباط افزایش بیان miR-182 با JAK2 V617F allele burden (۲۴).
- کاهش بیان miR-342 در PMF, PV 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 وPMF . 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).

www.SID.ir

Archive of SID

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-5p و miR-125a-3p 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 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 می شود.

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, e ssentialthrombocythemia and early primary myelofibro sis. 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

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 13(3): 215-223

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], Shirkoohi 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]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Adult Thalassemia Clinic, Tehran, Iran*
[4]*Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran , Iran*
[5]*Iran University of Medical Sciences, Rasool Akram Hospital, Tehran, Iran*
[6]*Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[7]*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 ± 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*

www.SID.ir