Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Upregulation of miR-155 induces cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia.

Mahdi Edalati[1], Shaban Alizadeh[1], Asghar Abdoli[2], Forouzan Karam[3], Aliakbar Shekarchi[4], Mahtab Sayadi[3]*

ABSTRACT

Background and Aims: According to the increasing evidence, abnormal expression of microRNAs is associated with tumorigenesis, tumor spread, and relapse in leukemias, including chronic myeloid leukemia (CML). The present study aimed to investigate the effect of miR-155 overexpression in K562 cells on cell cycle arrest and apoptosis induction.

Materials and Methods: The pLenti-III-pre miR-155-GFP vector was used to increase miR-155 expression in the K562 cell line through nucleofection compared to the pLenti-III-Backbone-GFP vector as a control group (Backbone). The flow cytometry method was employed to confirm the expression of the vector containing miR-155 in damaged cells. After transfection, the expression levels of miR-155, BAX, BCL2, CASP3, and TP53 were measured by the RT-qPCR method. The propidium iodide (PI) dye was used to study the cell cycle, and the stained cells were read by flow cytometry. The statistical significance was also defined as a P-value less than 0.05.

Results: After confirming the increase in miR-155 expression when cells transfected with miR-155 were compared with cells transfected with Backbone, cell cycle arrest was observed in the miR-155 group. In the cells with increased expression of miR-155, the change in G0/S and G1/S ratios compared to Backbone was shown to be 7.5 and 4.5, respectively ($P<0.05$). Moreover, 48 hours after transfection and in the group expressing miR-155, the expression of TP53, BAX, and CASP3 genes increased, and the expression of BCL2 decreased ($P<0.05$).

Conclusion: The increase in the level of miR-155 caused cell cycle arrest and increased pro-apoptotic gene expression, which indicates that miR-155 inhibits tumor growth in CML.

Keywords: Apoptosis, BAX, BCL-2, CASP3, Cell cycle, Chronic myelogenous leukemia, microRNA-155, TP53

Citation: Edalati M, Alizadeh Sh, Abdoli A, Karam F, Shekarchi A, Sayadi M. [Upregulation of miR-155 induces cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(1): 79-90. [Persian]

DOI 10.61186/JBUMS.31.1.79

Received: October 31, 2023 **Accepted:** April 7, 2024

[1] Department of Hematology and Blood Bank, Faculty of Paramedicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Department of Hematology and Blood Bank, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[4] Department of Pathology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
***Corresponding author:** Department of Hematology and Blood Bank, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
Tel: +989124148263 E-mail: sayadi.mahtab@yahoo.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

مقاله اصیل پژوهشی

تنظیم افزایشی miR-155 باعث القای توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در لوسمی میلوئیدی مزمن می‌گردد

مهدی عدالتی [1]، شعبان علیزاده [1]، اصغر عبدلی [2]، فروزان کرم [3]، علی اکبر شکارچی [4]، مهتاب صیادی [3]*

چکیده

زمینه و هدف: بر اساس شواهد روزافزون، بیان غیرطبیعی microRNA ها با تومورزایی، گسترش تومور و عود در لوسمی‌ها، از جمله لوسمی میلوئید مزمن (CML) مرتبط هستند. در این مطالعه اثر بیان بیش از حد miR-155 در سلول‌های K562 بر توقف چرخه سلولی و القا آپوپتوز بررسی گردید.

روش تحقیق: در این مطالعه بنیادی کاربردی، وکتورpLenti-III-pre miR-155-GFP برای افزایش بیان miR-155 در رده سلولی K562 از طریق نوکلئوفکشن در مقایسه با وکتور pLenti-III - Backbone-GFP به‌عنوان گروه کنترل (Backbone) مورداستفاده گرفت. از فلوسایتومتری برای تأیید بیان وکتور حاوی miR-155 در سلول‌های آسیب‌دیده استفاده شد. پس از ترانسفکشن، میزان بیان miR-155، BAX، BCL2، CASP3 و TP53 با روش RT-qPCR اندازه‌گیری شد. در بررسی چرخه سلولی از رنگ پروپیدیوم یدید(PI) Propidium Iodide استفاده گردید و سلول‌های رنگ‌آمیزی شده توسط فلوسایتومتری قرائت شدند. اهمیت آماری نیز به عنوان مقدار P کمتر از ۰/۰۵تعریف شد.

یافته‌ها: پس از تأیید افزایش بیان miR-155، هنگامی که سلول‌های ترانسفکت‌شده با miR-155 با سلول‌های ترانسفکت‌شده با Backbone، شدند، توقف چرخه سلولی در گروه miR-155 مشاهده شد. در سلول‌های با افزایش بیان miR-155، تغییر در نسبت‌های G0/S و G1/S در مقایسه با Backbone به ترتیب به ۷/۵ و ۴/۵ نشان‌داده شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، بیان ژن‌های TP53، BAX و CASP3 در گروه بیان کننده miR-155 افزایش و بیان BCL2 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: افزایش سطح miR-155 باعث توقف چرخه سلولی و افزایش سطح بیان ژن پرو آپوپتوز می‌شود که نشان می‌دهد miR-155 رشد تومور را در CML مهار می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، BAX، BCL-2، CASP3، چرخه سلولی، لوسمی میلوژن مزمن، microRNA-155، TP53.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱(۱): ۹۰-۷۹.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۹

[1] گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[2] گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

[3] گروه هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[4] دپارتمان پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

آدرس: بیرجند- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پیراپزشکی- گروه هماتولوژی و بانک خون

تلفن: ۰۹۱۲۴۱۴۸۲۶۳ نمابر: ؟؟؟ پست الکترونیکی: sayadi.mahtab@yahoo.com

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

مقدمه

لوسمی‌ها گروهی از اختلالات بدخیم هستند که با افزایش تعداد لکوسیت‌ها در خون و یا مغز استخوان ظاهر می‌شوند. در سال ۲۰۱۸، تخمین زده شده است که در مجموع ۴۳۷ هزار مورد جدید سرطان و ۳۰۹ هزار مرگ ناشی از سرطان خون در سراسر جهان وجود داشته است (۱).

لوسمی میلوئید مزمن یا لوسمی میلوژن مزمن (CML)[1] یک اختلال سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSC)[2] است. در CML، این اختلال با جابجایی t(9;22)(q34;q11) مشخص می‌شود که منجر به ادغام ژن‌های BCR و ABL1 به انکوژن بیماری‌زا BCR-ABL1 می‌شود که اثرات بعدی بسیاری بر مسیرهای پایین‌دستی دارد (۲). اثر اصلی این انکوژن، فعال کردن مسیر تیروزین کیناز است که منجر به تکثیر HSC های جهش یافته در مقایسه با HSCهای طبیعی و جابجایی تدریجی HSCهای طبیعی می‌شود (۳).

میزان بروز CML در سراسر جهان سالانه ۰/۸۷ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است که با افزایش سن تا ۱/۲۵ در بیماران بالای ۷۰ سال افزایش می‌یابد. یک غلبه خفیف مردانه وجود دارد. سن متوسط تشخیص ۵۶ سال است(۴). تقریباً نیمی از بیماران مبتلا به CML بدون علامت هستند و با شمارش معمول خون کامل تشخیص داده می‌شوند. اکثر بیماران در فاز مزمن CML هستند. CML، در فاز مزمن، اغلب با علائم مربوط به کم‌خونی و اسپلنومگالی تظاهر می‌کند. با پیشرفت CML به فاز تسریع شده یا فاز بلاست، علائمی مانند سردرد، درد استخوان، تب، درد مفاصل، خونریزی، عفونت و لنفادنوپاتی شایع‌تر می‌شوند (۵).

MicroRNA(miRNAs) ها RNA های غیرکدکننده‌ای هستند که از مناطق غیر کدکننده ژنوم رونویسی می‌شوند. RNA miRNAs هایی با ۱۹-۲۴ نوکلئوتید طول هستند که بیان ژن را در سلول‌های یوکاریوتی با اتصال به ناحیه ترجمه نشده ۳' [3] (3' UTR) RNA های پیام‌رسان هدف، تنظیم می‌کنند (۶).

miRNA ها تنظیم کننده‌های منفی هستند که فعالیت‌های ژن را از طریق سرکوب ترجمه‌ای با هدف قرار دادن ۳'-UTR در mRNA ژن‌های کدکننده پروتئین یا با ایجاد بی‌ثباتی mRNA محدود می‌کنند (۷).

در مقایسه با رده‌های سلولی غیر CML و خون سالم، miR-31، miR-155 و miR-564 در رده‌های سلولی CML و بیماران CML کاهش می‌یابد (۸). این یافته منجر به شناسایی miRNA های متعددی شد که واسطه تبدیل سلول‌های خون‌ساز اولیه انسان به سلول‌های بدخیم هستند. همچنین مشخص شده است که miR-31 و miR-155که در CML کاهش می‌یابند، ممکن است[4] CBL را مورد هدف قرار دهند (۹).

miR-155 نمونه‌ای از miRNA چند منظوره است، هردو سلول لنفوئیدی و میلوئیدی miR-155 را بیان می‌کنند، اگرچه که مقدار این miRNA متغیر و وابسته به نوع سلول می‌باشد (۴). ارتباط miRNA های خاص دیگری نیز اخیراً با پاتوژنز چندین تومور جامد (از جمله سرطان تخمدان، پستان و کولورکتال) و همچنین بدخیمی‌های خونی (لوسمی لنفوسیتی مزمن [5](CLL)، لنفوم‌های سلول B، لوسمی حاد پرومیلوسیتیک، لوسمی حاد لنفوسیتی (ALL) و CML گزارش شده است (۱۰).

درمان‌هایی که در حال حاضر برای بیماران CML استفاده می‌شوند عبارتند از مهارکننده‌های تیروزین کیناز که به صورت تجاری در دسترس هستند و مقرون به صرفه می‌باشند، از جمله ایماتینیب نسل اول و داساتینیب، نیلوتینیب و بوسوتینیب نسل دوم. برای فاز مزمن، CML متوسط یا پرخطر، مهارکننده‌های تیروزین کیناز نسل دوم (بوسوتینیب، داساتینیب، نیلوتینیب) به عنوان درمان خط اول ممکن است مزایای بیشتری نسبت به ایماتینیب داشته باشد (۱۲, ۱۱). پوناتینیب، یک مهارکننده نسل سوم تیروزین کیناز، یک گزینه درمانی خط سوم می‌باشد (۱۳).

CML پیشرفته (فاز تسریع شده یا انفجاری) ملاحظات درمانی بیشتری دارد. درمان با مهارکننده‌های تیروزین کیناز نسل دوم یا سوم باید برای کاهش بار CML آغاز شود و برای پیوند سلول‌های

[1] Chronic Myelogenous/ Myeloid Leukemia
[2] Hematopoietic Stem Cell
[3] 3′ untranslated regions
[4] CBL (Cbl Proto-Oncogene)

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

بنیادی خون‌ساز[1] آلوژنیک اولیه (HSCT) در نظر گرفته شود (۵).

جهش‌های مرتبط با مقاومت به درمان در بیش از ۳۰ درصد از بیماران CML تحت درمان با مهارکننده‌های تیروزین کیناز ایجاد می‌شود (۱۳).

علیرغم پیشرفت‌ها در توسعه مهارکننده‌های تیروزین کیناز قوی‌تر، برخی مکانیسم‌ها به‌ویژه وجود سلول‌های بنیادی لوسمیک CML (CML LSC) منجر به مقاومت درمانی درونی یا اکتسابی، عود و پیشرفت بیماری می‌شوند. در این شرایط پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک گزینه درمانی بعدی هستند (۱۴). از چالش‌های پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک یافتن اهداکننده سازگارهمچنین استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی است که بیماران را در معرض آلودگی با سایر عوامل بیماری‌زا قرار می‌دهد. سندرم انسداد سینوسی[2]؛ موکوزیت[3]؛ بیماری حاد پیوند در مقابل میزبان(aGVHD)[4]؛عوارض مزمن شامل بیماری مزمن پیوند در مقابل میزبان(cGVHD) [5]، عفونت با باکتری‌های کپسول‌دار[6] و فعال شدن مجدد ویروس واریسلا–زوستر[7] نیز از عوارض پیونداست (۱۵).

درمان‌های گفته شده هنوز به‌طور کامل موفقیت‌آمیز نیستند و هنوز محدودیت‌ها و چالش‌های بسیاری برای درمان بیماران CML وجود دارد. رویکردهای جدید برای درمان و بهبود کیفیت زندگی بیماران درگیر با CML حائز اهمیت هستند، از این رو این مطالعه با هدف بررسی افزایش بیان miR-155 در سلول‌های CML انجام شد و در این مطالعه نشان داده شد که بیان بیش از حد miR-155 در سلول‌های CML با فعال کردن پروتئین‌های پروآپوپتوز، کاهش فعالیت ضد آپوپتوزی و توقف چرخه سلولی، درنهایت القای آپوپتوز را در سلول‌های K562 افزایش می‌دهد و می‌تواند به عنوان یک روش بالقوه برای درمان بیماران CML درنظر گرفته شود.

روش تحقیق

مطالعه انجام شده مطابق با مصوبه اخلاق در پژوهش به شماره IR.TUMS.REC.1394.475 در دانشگاه علوم پزشکی تهران، مورد تصویب کمیته اخلاق قرار گرفت.

کشت سلولی

رده سلولی لوسمی میلوژن مزمن k562 از مؤسسه بن‌یاخته ایران تهیه شد. با توجه به دستورالعمل موجود، سلول‌های k562 شبیه لنفوبلاست در محیط کشت Roswell(Biosera, France) Park Memorial Institute (RPMI) 1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco™,United States)(FBS) و پنی سیلین–استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) رشد داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند.

ترانسفکشن

کیت Amaxa Nuleofection رده سلولی k562 (Lonza, USA) برای ترانسفکت سلول‌ها استفاده گردید. به‌طور مختصر، تعداد 1×10^{6} در میلی‌لیتر سلول k562 به یک کووت اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO2 و رطوبت ۹۵ درصد نگه‌داری شد. وکتورهای پلاسمید miR-155 و گروه Backboneطبق دستورالعمل سازنده استخراج شدند. پلاسمید به هر واکنش با مقدار ۲ میلی‌گرم در هر واکنش اضافه گردید. نرم‌افزار دستگاه نوکلئوفکتشن (برنامه T-0001) طبق دستور انتخاب شد و کووت در معرض جریان الکتریکی قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، تولیدGFP به‌عنوان نشانگر ورود پلاسمید به سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری برای محاسبه ترانسفکشن به صورت کمّی مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی RNA و سنتز cDNA

RNA کل از سلول‌های ترانسفکت شده و کنترل ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با استفاده از معرف استخراج RNA(Trizol)

[1] Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)
[2] Sinusoidal Obstruction Syndrome
[3] Mucositis
[4] Acute Graft Versus Host Disease (aGVHD)
[5] Chronic GVHD (cGVHD)
[6] Encapsulated Bacteria
[7] Varicella-Zoster Virus

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از آنزیم پلی (A) پلیمراز برای پلی‌آدنیله کردن ۵ میلی‌گرم RNA کل به عنوان یک الگو مورد استفاده قرار گرفت. یک کیت سنتز cDNA (Fermentas, Massachusetts, USA) و پرایمرهای اختصاصی برای ساخت DNA مکمل (cDNA) استفاده شد.

بررسی بیان miRNA ها با استفاده از RT-qPCR

پرایمرهای RT-qPCR با توالی خاص را برای miR-155 و کنترل داخلی Snord47 از مرکز تحقیقات بن یاخته در ایران تهیه گردید. تنظیمات RT-qPCR در دستگاه ABI real-time PCR (Corbett, Mortlake, Australia) با Taq DNAPolymerase Master Mix (Amplicon, Rodovre,Denmark) طبق پروتکل زیر مورد استفاده قرار گرفت. برای۴۰ سیکل (n=۳)، به مدت ۱۰ دقیقه تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه گرم شدند. پس از نرمال‌سازی با کنترل داخلی Snord47، مقادیر آستانه چرخه[1] (Ct) و بیان نسبی ژن miRNA ها با روش ΔΔC (n=۳) محاسبه شد. توالی پرایمرهای استفاده شده برای سنجش miR-155 در جدول ۱ قابل مشاهده است.

بررسی بیان ژن با استفاده از RT-qPCR

پرایمرهای PCR برای BAX، BCL-2 و CASP3 و همچنین GAPDH را به‌عنوان ژن کنترل داخلی توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه گردید. دستگاه ABI Real-time PCR برای اجرای RT-qPCR تحت شرایط زیر استفاده شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، سپس ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه تا حداکثر ۴۰ سیکل (n=۳). به‌دنبال نرمال‌سازی GAPDH، ژن کنترل داخلی و تغییرات کمی نسبی ژن‌های هدف با استفاده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقادیر بیان mRNA محاسبه شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۲ آورده شده است.

چرخه سلولی

۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن (همان‌طور که قبلاً گفته شد)، تعداد 1×10^{6} سلول k562 برداشته و در PBS شسته شد. سلول‌ها پس از تثبیت در اتانول ۹۸ درصد مجدد در PBS شستشو داده شدند. ۱۰۰ گرم در میلی‌لیتر RNase A و ۲۰۰ گرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم یدید (PI) (Sigma-Aldrich, MO, USA) به سلول‌های تثبیت شده، اضافه گردید. در دستگاه (Partec, Partec Muenster, Germany)، فلوسیتومتری برای ارزیابی چرخه سلولی استفاده شد و نرم‌افزار FlowJo 8.7.1 (Tree star, Ashland, OR, USA) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و مدل‌سازی چرخه سلولی استفاده شد. به عنوان شاهد، از سلول‌های تازه و تیمار نشده استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمون t- student برای ارزیابی تفاوت‌ها بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۷ استفاده شد. اهمیت آماری نیز به عنوان مقدار P کمتر از ۰/۰۵تعریف شد.

یافته‌ها

افزایش بیان miR-155 در سلول‌های K562

سطح بیان miR-155 در هر دو گروه سلول‌های ترانسفکت شده با miR-155 وBackbone با استفاده از RT-qPCR، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های k562 با نوکلئوفکتور مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ نشان می‌دهد که سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید بیان کننده miR-155، ۲۰ برابر بیشتر از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید بیان کننده Backbone، miR-155 را بیان کرده‌اند.

[1] Ct (cycle threshold)

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

تأثیر بیان بیش از حد miR-155 بر P53، Caspase 3، BCl-2 و BAX در رده سلولی k562

پس از تأیید بیان بیش از حد miR-155 در سلول‌های k562، تغییرات بیان ژن‌های P53، Caspase 3، BCl-2 و BAX را با گروه کنترل مقایسه کردیم. شکل ۲ نشان می‌دهد که سطح بیان P53، یک پروتئین سرکوبگر تومور، در مقایسه با سلول‌های گروه Backbone، تقریبا ۴ برابر (p-value 0.01) افزایش یافته است. در مقایسه با گروه Backbone، سطوح Caspase 3 ۱۱ برابر (p-value 0.001) افزایش یافت، در حالی که سطوح BAX، ۱۲ برابر (p-value 0.001) افزایش یافت که نشان می‌دهد افزایش بیان بیش از حد miR-155 باعث افزایش تعداد پروتئین‌های آپوپتوز می‌شود. در روش تنظیم سلولی، miR-155 باعث کاهش مقدار ژن BCL-2 به عنوان یک پروتئین ضد آپوپتوز می‌شود (P-value ۰/۰۵).

miR-155 باعث توقف فاز G1 در سلول های k562 می‌شود

توقف فاز G1 و کاهش جمعیت فاز S در سلول‌هایی که miR-155 بیش از حد بیان می‌شوند. برای مطالعه بیشتر مهار رشد ناشی از miR-155، تغییرات در پیشرفت چرخه سلولی با استفاده از روش‌های فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش miR-155 منجر به توقف نسبی چرخه سلولی G1 شد. سلول‌های با افزایش miR-155، زیر گروه G1 را افزایش دادند (۶۲ درصد در گروه تحت درمان با miR-155، ۴۸ درصد در گروه کنترل و ۴۵ درصد در Backbone) و سلول‌های زیرگروه فاز S را در مقابل Backbone و گروه کنترل کاهش دادند (۷ درصد در گروه تحت درمان با miR-155، ٪۳۱ در گروه کنترل و ٪۲۸ در Backbone) و هیچ تغییر قابل توجهی در زیر گروه G2/M مشاهده نشد (شکل ۳).

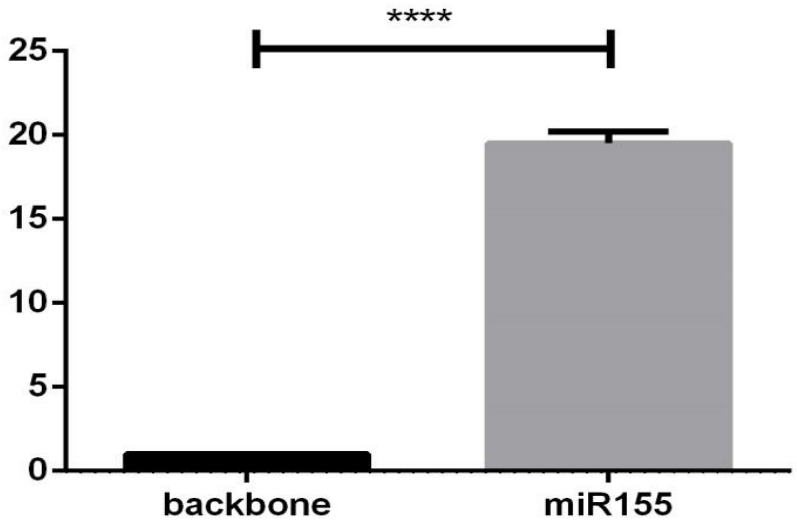
جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده برای miR-155

پرایمر	توالی پرایمر (’3-’5)
miR-155	Stem-loop RT: GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTC GCACTGCATACGACACCCCT Forward: 5´-CGGTTTAATGCTAATCGTGA-3´ Reverse: 5´-GAGCAGGGTCCGAGGT-3
Snord47	Stem-loop RT: GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGCATACGACAACCTC Forward: 5´-ATCACTGTAAAACCGTTCCA-3´ Reverse: 5´-GAGCAGGGTCCGAGGT-3

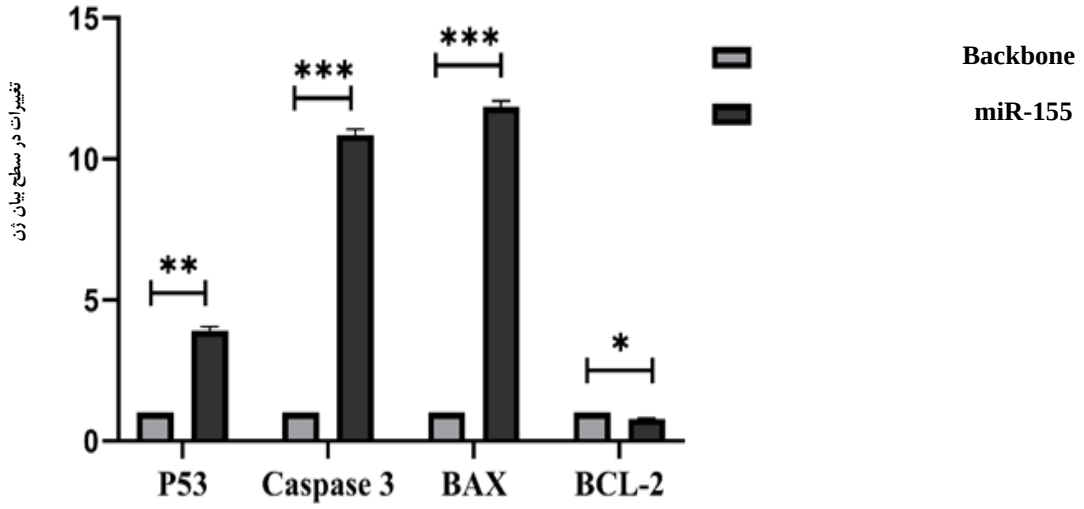
جدول ۲ - توالی پرایمرهای استفاده شده در RT-qPCR

نام ژن	توالی پرایمر (’3-’5)
BAX forward	GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG
BAX reverse	CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA
CASP3 forward	TTAGTGATAAAAATAGAGTTCTTTTGTGG
CASP3 reverse	TTAATAAAGGTATCCATGGAGAACACT
BCL-2 forward	CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC
BCL-2 reverse	GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA
P53 forward	GCGTGTGGAGTATTTGGATG
P53 reverse	TGGTACAGTCAGAGCCAACC
GAPDH forward	TGC ATC CTG CAC CAC CAA CT
GAPDH reverse	AGC CTG CTT CAC CAC CTT C

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

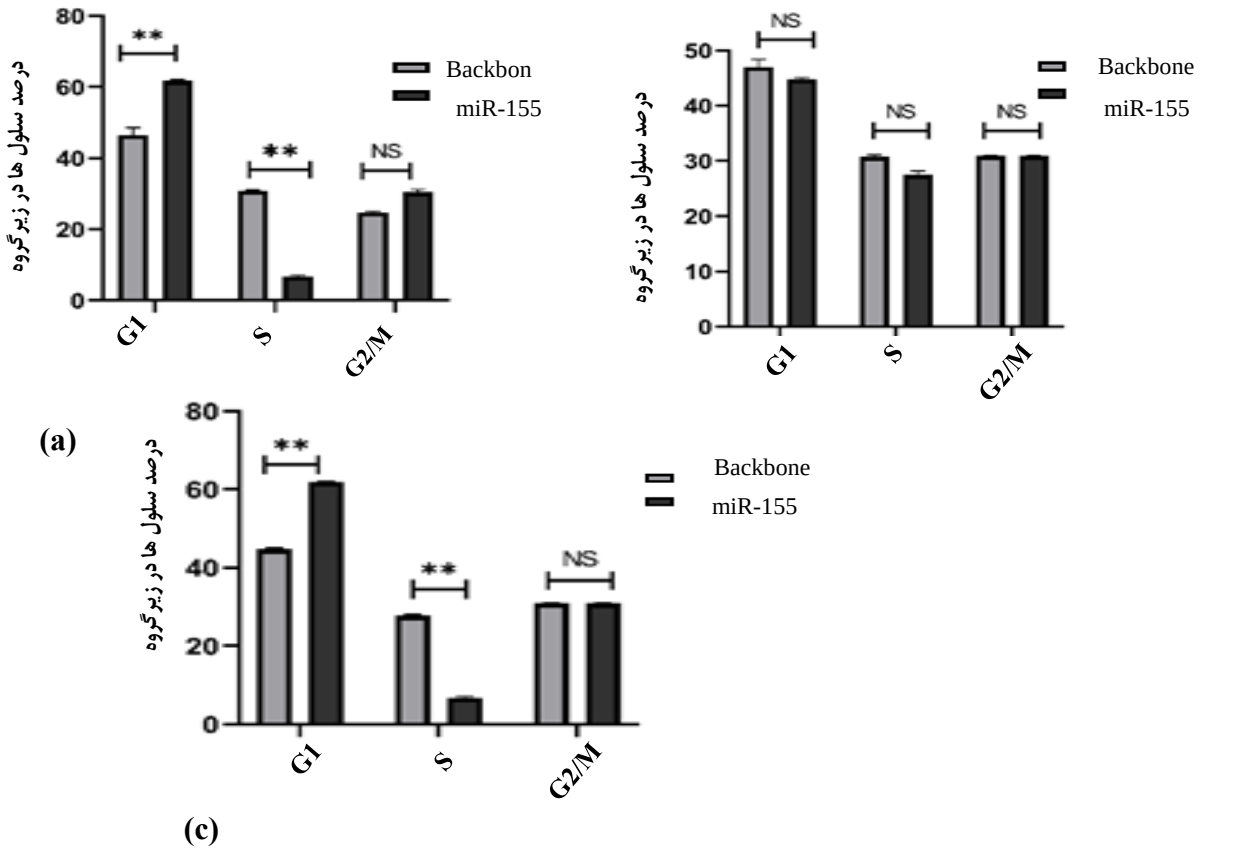


شکل ۱- بیان miR-155 در سلول‌های k562. بیان miR-155 ۲۰ برابر بیشتر در سلول‌های ترانسفکت شده با miR-155 در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با Backbone. ***P<۰/۰۱.



شکل ۲- نمایش تغییرات بیان ژن در P53، Caspase 3، BCl-2، و BAX در رده سلولی k562. سطح بیان P53 در مقایسه با سلول‌های گروه Backbone حدود ٤ برابر افزایش یافت. سطح Caspase 3 نیز نسبت به گروه Backbone ۱۱ برابر و BAX ۱۲برابر افزایش یافت. این افزایش سطح پروتئین‌های آپوپتوز را به دلیل افزایش بیان miR-155 نشان می‌دهد. miR-155 باعث کاهش سطح ژن BCL-2 می‌شود.* P<۰/۰۵، ** مقدار P <۰/۰۱، *** مقدار P<۰/۰۱

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]



شکل ۳- مقایسه زیرگروه‌های G1، S و G2/M در گروه تحت درمان با miR-155 در مقابل Backbone و گروه کنترل. (a) مقایسه زیرگروه‌های G1، S و G2/M در سلول‌های تیمار شده با miR-155 در مقابل گروه کنترل درمان نشده. (b) مقایسه زیرگروه‌های G1، S و G2/M در سلول‌های تیمار شده با Backbone در مقابل گروه کنترل درمان نشده. (c) مقایسه زیرگروه‌های G1، S و G2/M در سلول‌های تیمار شده با miR-155 در مقابل تیمار شده با گروه Backbone. ** (P<۰/۰۱)، NS (معنی‌دار نیست).

بحث

بیان متمایز miRNA برای مشارکت در مسیرهای تنظیمی درگیر در ایجاد و پیشرفت بسیاری از انواع تومورها شناخته شده است. بر این اساس، تا به امروز، تمام بدخیمی‌های بررسی شده، پروفایل‌های miRNA بسیار متفاوتی در مقایسه با سلول‌های طبیعی از همان بافت را نشان داده‌اند. گزارش شده است که این امضاهای بیان miRNA با تشخیص، پیش‌آگهی و پاسخ به درمان مرتبط هستند(۱۶). از آنجایی که miRNA ها طیف وسیعی از مسیرهای مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، مطالعه بیان miRNA در سرطان انسان ممکن است درک بهتری از مسیرهای مولکولی که در پاتوژنز و پیشرفت سرطان نقش دارند، ارائه دهد.

در رابطه با نقش miR-155 در شرایط و بیماری‌های مختلف اختلاف نظر وجود دارد. افزایش بیان miR-155 در دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای انسان از سلول‌ها در برابر آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان کبد، پروستات و دهانه رحم محافظت می‌کند (۱۷)، درحالی‌که درسلول‌های سرطانی کلیه موجب القای آپوپتوز می‌شود. بعضی شواهد نقش ضد لوسمی miR-155 در AML[1] نوع وحشی FLT3 انسانی، با القای آپوپتوز سلولی و تمایز میلومونوسیتی را ارائه می‌کند که برخلاف نقش فرضی قبلی آن به عنوان یک انکوژن است. این امر پیچیدگی تنظیم ژن توسط microRNAهایی را که ممکن است بسته به زمینه بیماری یا نوع بافت اثرات سرکوب‌کننده تومور یا انکوژن داشته باشند، برجسته می‌کند (۱۸). از ویژگی‌های اصلی سلول‌های مبتلا به CML می‌توان به استقلال چسبندگی،

[1] Acute Myeloblastic Leukemia

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

استقلال فاکتور رشد و مقاومت به آپوپتوز اشاره کرد. از دست دادن یا جهش ژن سرکوبگر تومور، P53، یکی از شایع‌ترین جهش‌های ثانویه در بحران بلاست CML است. انتقال بین فاز مزمن و بحران بلاست با افزایش مقاومت به آپوپتوز مرتبط با پیش‌آگهی ضعیف همراه است(۱۹). در مطالعه حاضر افزایش بیان miR-155 در رده سلولی K562 منجر به تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی و توقف چرخه سلولی گردید.

پروتئینTP53، یک پروتئین سرکوبگر تومور و p27 Kip1 (Cdknb1)، به‌عنوان یک مهارکننده چرخه سلولی، با تنظیم تکثیر مرتبط است. پروتئین TP53 در تنظیم تکثیر سلولی در سلول‌های مختلف نقش دارد(۲۰). مشخص شده است که از بین بردن TP53−/− تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد (۲۱). Yue Wang و همکارنش در مطالعه‌ای برای درک اثر miR-155 بر بیان P53، به بررسی اثر افزایش بیان miR-155 بر لوپ miR-155/Sirt1/P53 پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که miR-155 با اتصال به ناحیه 3'-UTR بر روی mRNA ژن Sirt1، باعث کاهش بیان این ژن از طریق مهار ترجمه می‌شود. کاهش بیان Sirt1 منجر به فراتنظیمی پروتئین P53 می‌گردد (۲۲).

در مطالعه حاضر، ما نشان دادیم که افزایش بیان miR-155 منجر به افزایش بیان ژن TP53 را در رده‌های سلولی k562 در مقایسه با گروه Backbone، است که با نتایج Yue Wang و همکارانش هم‌خوانی دارد.

Oshrat Hershkovitz Rokah، در مطالعه خود بر روی بیماران CML، تأیید کرد که بیان miR-155 در این بیماران کاهش یافته است (۹). به خوبی مشخص شده است که تغییرات در بیان TP53 در CML به شدت با پیش‌آگهی بدتر و ورود به بحران پلاستیک مرتبط است که به نظر می‌رسد کاهش miR-155 در این بیماران واسطه کاهش p53 شده و منجر به پیش‌آگهی بدتر در بیماران مبتلا باشد.

علاوه براین، ما نشان دادیم که بیان بیش از حد miR-155 باعث افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوز CASP3 و BAX می‌شود. در مطالعه HaiQiang Wang و همکاران، ترکیبی از هیبریداسیون درجا و ایمونوهیستوشیمی نشان داد که miR155 در سیتوپلاسم سلول‌های NP انسانی با ارتباط منفی با FADD و CASP3 بیان می‌شود. مطالعه آن‌ها نشان می‌دهد که miR155، کاسپاز ۳ (caspase 3) را هدف قرار می‌دهد.

به نظر می‌رسد در مطالعه ما فعال شدن آبشار آپوپتوز، TP53 و درنهایت پروتئین BAX باعث افزایش CASP3 می‌شود که نسبت به هدف‌گیری مستقیم miR-155 در تنظیم پایین CASP3 مؤثرتر است. فعال‌سازی BAX باعث تغییرات ساختاری و در نهایت نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و همچنین فعال‌شدن کاسپاز می‌شود که منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود (۲۳). این نتایج با نتایج مطالعه قبلی ما مطابقت دارد که در آن مطالعه نشان داده شده است miR-155 باعث مرگ سلولی و آپوپتوز در لوسمی میلوژن مزمن می‌شود (۲۴). از آنجایی که TP53 تولید BAX، یک پروتئین پروآپوپتوز، را تنظیم می‌کند، فعال شدن TP53 در نتیجه بیان بیش از حد miR-155 به احتمال زیاد دلیل این افزایش است (۲۵). کاهش بیان ژن BCL2 به‌عنوان یک پروتئین ضد آپوپتوز، یک مسئله تأییدکننده با آبشار آپوپتوز است که در نتیجه افزایش miR-155 شروع شده است.

در مطالعه Xiao-Hua Sun و همکارانش مشاهده شد که سطح بیان Bcl-2 در سلول‌های عصبی هیپوکامپ در گروه تقلیدکننده miR-155 به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. در آن مطالعه نتیجه‌گیری شد که miR-155 با تعدیل سطوح Bax، Bcl-2 و cleaved-caspase-3 به افزایش آپوپتوز سلول‌های عصبی هیپوکامپ کمک می‌کند. نتایج مطالعه ذکر شده با مطالعه ما هم‌راستا بود (۲۶). در مطالعات دیگری مشخص شد که ارتقاء تنظیم وابسته به miRNA های همولوگ miR-192 و miR-215 TP53 باعث توقف چرخه سلولی می‌شود که نشان می‌دهد شبکه TP53 از خانواده‌های miRNA زیادی تشکیل شده است (۲۷). همچنین نتایج ما که نقش miR-155 را در سرکوب تکثیر سلولی و توقف چرخه سلولی در CML گزارش می‌کند، همراه با مشاهدات اخیر مبنی بر اینکه miR-155 در CML بیان نشده است، این موضوع، این فرضیه را تأیید می‌کند که miR-155 یک

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

سرکوب‌کننده تومور است. در CML تأثیر مهاری TP53 بر روی checkpointsهای G1 و G2 یکی از مؤثرترین عملکردهای آن است (۲۸).

علاوه براین، تحقیقات متعدد نشان داده است که TP53 دست نخورده ممکن است منجر به توقف طولانی مدت چرخه سلولی شود (۲۹). به گفته Jingtian Liu و همکاران، miR-155 با سرکوب CTHRC1 و شروع توقف چرخه سلولی، توسعه سرطان کولورکتال و متاستاز را در شرایط آزمایشگاهی مهار کرد (۳۰). در اینجا ما دریافتیم که افزایش تولید miR-155 در یک رده سلولی k562 که پروتئین نوع وحشی TP53 را بیان می‌کند باعث توقف چرخه سلولی در هر دو فاز G1 و G2 و همچنین افزایش نسبت G1/S شد.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان miR-155 باعث توقف چرخه سلولی و افزایش سطح بیان ژن پرو آپوپتوز می‌شود که نشان می‌دهد miR-155 رشد تومور را در CML مهار می‌کند.

تقدیر و تشکّر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکترای تخصصی تحت عنوان بررسی "تأثیر افزایش بیان miR-155 بر القای آپوپتوز بر رده سلولی K562" با کد پروپوزال ۹۰۲۲۱۵۴۰۰۱ می باشد. بدین وسیله بر خود لازم می‌دانیم از تمام عزیزانی که در اجرای این مطالعه یاری‌مان کردند، تقدیر و تشکر نماییم.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و کمیته اخلاق در پژوهش با کد IR.TUMS.REC.1394.475 انجام شد.

حمایت مالی

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که این تحقیق از هرگونه حمایت دولتی یا سازمانی برای تأمین مالی مستثنی است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در مراحل مختلف ایده پردازی، تأمین وسایل و مواد مورد نیاز، انجام آزمایشات و نگارش و ویرایش مقاله همکاری لازم را برعهده داشته‌اند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018; 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492

2- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. Am J Hematol. 2020; 95(6): 691-709. DOI: 10.1002/ajh.25792

3- Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. Ulster Med J. 2007; 76(1): 8-17. PMID: 17288299 PMCID: PMC1940291

4- Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 364(3): 509-14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.077.

5- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. Am J Hematol. 2018; 93(3): 442-59. DOI: 10.1002/ajh.25011

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

6- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116(2): 281-97. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5

7- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 2004; 303(5654): 83-6. DOI: 10.1126/science.1091903

8- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000; 96(10): 3343-56. PMID: 11071626

9- Hershkovitz Rokah O, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. PLoS One. 2012; 7(4): e35501. DOI: 10.1371/journal.pone.0035501

10- Georgantas III RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(8): 2750-5. DOI: 10.1073/pnas.0610983104

11-Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. J Clin Oncol. 2016; 34(20): 2333-40. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.8899

12- Nakamae H, Fukuda T, Nakaseko C, Kanda Y, Ohmine K, Ono T, et al. Nilotinib vs. imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: long-term follow-up of the Japanese subgroup of the randomized ENESTnd trial. Int J Hematol. 2018; 107(3): 327-36. DOI: 10.1007/s12185-021-03216-5

13- Nair AP, Barnett MJ, Broady RC, Hogge DE, Song KW, Toze CL, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is an Effective Salvage Therapy for Patients with Chronic Myeloid Leukemia Presenting with Advanced Disease or Failing Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors. Biol Blood Marrow Transplant. 2015; 21(8): 1437-44. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.04.005

14- Mojtahedi H, Yazdanpanah N, Rezaei N. Chronic myeloid leukemia stem cells: targeting therapeutic implications. Stem Cell Res Ther. 2021; 12(1): 603. DOI: 10.1186/s13287-021-02659-1

15- Niederwieser C, Kröger N. Transplantation in CML in the TKI era: who, when, and how? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2022; 2022(1): 114-22. DOI: 10.1182/hematology.2022000329

16- Gupta A, Khattry N, Current status of hematopoietic stem cell transplant in chronic myeloid leukemia. Indian J Med Paediatr Oncol. 2014; 35(3): 207–210. DOI: 10.4103/0971-5851.142036

17- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006; 6(11): 857-66. DOI: 10.1038/nrc1997

18- Li S, Chen T, Zhong Z, Wang Y, Li Y, Zhao X. microRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells. Mol Med Rep. 2012; 5(4): 949–954. DOI: 10.3892/mmr.2012.779

19- Palma CA, Al Sheikha D, Lim TK, Bryant A, Vu TT, Jayaswal V, et al. MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. Mol Cancer. 2014; 13: 79. DOI: 10.1186/1476-4598-13-79.

20- Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. Oncologist. 2000; 5(5): 405-15. DOI: 10.1634/theoncologist.5-5-405

21- Casalini P, Iorio MV, Berno V, Bergamaschi A, Dale AL, Gasparini P, et al. Relationship between p53 and p27 expression following HER2 signaling. Breast. 2007; 16(6): 597-605. DOI: 10.1016/j.breast.2007.05.007

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]

22- Gil-Perotin S, Haines JD, Kaur J, Marin-Husstege M, Spinetta MJ, Kim KH, et al. Roles of p53 and p27(Kip1) in the regulation of neurogenesis in the murine adult subventricular zone. Eur J Neurosci. 2011; 34(7): 1040-52. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07836.x

23- Morotti A, Carrà G, Crivellaro S. The p53 orbit in chronic myeloid leukemia: time to move to patient care. Transl. Cancer Res.2016: 5(Suppl 6). S1288-S1291. URL: https://tcr.amegroups.org/article/view/10759/html

24- Weng C, Li Y, Xu D, Shi Y, Tang H. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. J Biol Chem. 2005; 280(11): 10491-500. DOI: 10.1074/jbc.M412819200

25- Fathabad ME, Karimipoor M, Alizadeh S, Abdoli A, Atashi A, Sayadi M. miR-155 effectively induces apoptosis in K56 ۲Philadelphia positive cell line through upregulation of p27kip1. Bioimpacts. 2017; 7(2): 109-14. DOI: 10.15171/bi.2017.14

26- Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74(4): 609-19. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90509-o

27- Sun XH, Song MF, Song HD, Wang YW, Luo MJ, Yin LM. miR‑155 mediates inflammatory injury of hippocampal neuronal cells via the activation of microglia. Mol Med Rep. 2019; 19(4): 2627-35. DOI: 10.3892/mmr.2019.9917

28- Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, et al. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. Cancer Res. 2008; 68(24): 10105-12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1846

29- Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. Oncogene. 2001; 20(15): 1803-1815. DOI: 10.1038/sj.onc.1204252

30- Schwartz D, Almog N, Peled A, Goldfinger N, Rotter V. Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma-irradiation-induced delay and DNA repair. Oncogene, 1997; 15(21): 2597-607. DOI: 10.1038/sj.onc.1201436

[DOI: 10.61186/JBUMS.31.1.79]