Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(122): 25-37

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

Hengamesadat Razavi[1], Shaban Alizadeh[2*], Amir Atashi[3], Parvin Rahmani[1]

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, Shahroud University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Received: 31 Dec 2016, Accepted: 12 Jul 2017

Abstract

Background: Fetal hemoglobin (α2γ2) 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-regultion 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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۵ (شماره پیاپی ۱۲۲)، مرداد ۱۳۹۶، ۳۷-۲۵

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 و۱۴ ، 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.

نتیجه گیری: شواهد نشان می‌دهد که افزایش miR-940 در بالا رفتن بیان زنجیزه 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 کم خونی 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

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 درهموگلوبین هم چون آنمی داسی شکل و تالاسمی بتا از دلایل اصلی مرگ و میر در جهان به شمار می‌آید. در این اختلالات افزایش مقدار Hb F سودمند بوده و به عنوان یک مکانیسم جبرانی سبب کاهش قابل ملاحظه علائم بالینی بیماران می‌شود(۵، ۸). یکی از مشکلات اصلی که بیماران βتالاسمی ماژور با آن روبه رو 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 واریتروئن 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 β 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 HbFمشخص شده که شامل اهداف ملکولی برای القاءهموگلوبین F است(۱-۴).

microRNA مولکول‌های تک رشته‌ای کوچک و غیر کدکننده هستند که از ۲۴-۱۸ نوکلئوتید ساخته شده‌اند. این ریز 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 بوتبرات 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 به سزایی 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 واکنش زنجیره پلیمراز (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 $\mu l/_{ml}$ ۵۰ استخراج شده است.

مرحله هضم و اتصال

پلاسمید و قطعه pre-miR-940 به طور جداگانه مورد هضم دو آنزیم محدود کننده XhoI و EcoRI (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 T4DNA ligase (TAKARA) 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 $100^{\mu g}/_{ml}$ و استرپتومایسین $100^{\mu g}/_{ml}$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار۵٪ 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 وکتور 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 ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه انکوبه شدند. cDNA سنتز شده در دمای 20- 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 20µl انجام شد.ابتدا پرایمرهای با غلظت ۵۰ نانو مول تهیه شده است. به ازای هر واکنش 10µl از SYBR premix Taq (TAKARA) ، 0.5µl از هر پرایمر، 2µl از محصول cDNA و 7µl 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 Green (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 پیک 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

کار رقت‌های متفاوت از یک cDNA تهیه کرده، سپس برای آن‌ها تست Real-time PCR انجام داده و از Ctهای 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 ژن‌ها بر اساس فرمول (-ΔΔCT) که نسبت بیان ژن هدف را به ژن رفرانس محاسبه می‌کند. در این بررسی یک ژن رفرانس (GAPDH) و چند ژن هدف وجود دارد. یک گروه (گروه کنترل) به عنوان کالیبراتور شناخته می‌شود و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود. تمام ارزیابی‌های کمی ژن‌ها 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 داده‌ها از نرم افزار آماری spss نسخه 20 استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در واکنش‌ها

gene	Primer sequence
Pre miR-940	Forward : 5’ GAATTCCTCTTAGGGCCTTGGGTTTG 3’
	Reverse : 5’ CTCGAGGTCACTTAGGCTGCTCAT 3’
γ-chain	Forward: 5’ GGAGGACAAGGCTACTATCA 3’
	Reverse: 5’ GAATTCTTTGCCGAAATGGA 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’

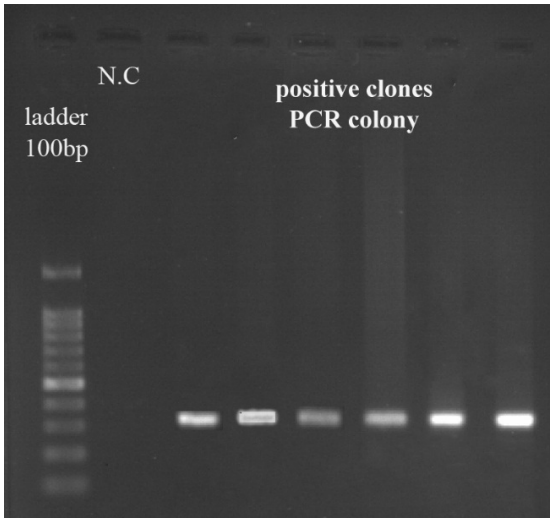
فلوسیتومتری

فاز نهایی کار، بررسی تمایز سلول‌ها از لحاظ شاخص‌های سطحی که با تکنیک فلوسیتومتری انجام شد. جهت بررسی بیان سطحی CD235a و CD71 از آنتی بادی اولیه غیرنشاندار که با آنتی بادی ثانویه نشاندار با FITC شناسایی می‌گردد، استفاده شد. هر دو آنتی بادی‌ها از شرکت Exbio (Czech Republic) خریداری شد. ابتدا 10^5 سلول شمارش شد و با PBS شستشو داده شدند. سپس 100µl از 3% BSA و 10µl آنتی‌بادی اولیه (Iso antibody,anti-CD235) به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال انکوبه گردید. دوباره با 1ml از محلول PBS سرد شستشو داده و در 100µl از BSA3% معلق شدند. سپس 2µl آنتی بادی ثانویه اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال انکوبه گردید. سپس در دستگاه قرائت شد.

یافته‌ها

نتیجه مربوط به Colony PCR به منظور انتخاب کلنی‌های مثبت

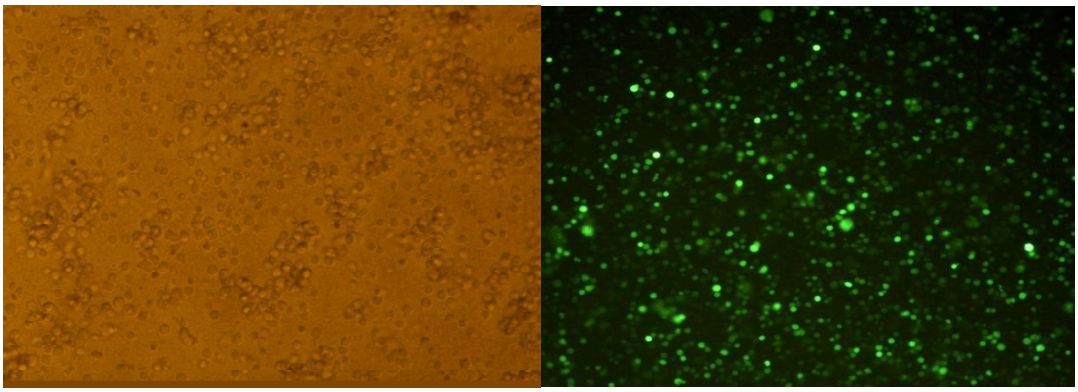
پس از انجام واکنش Ligation و انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به درون باکتری، باکتری‌های حاصل در پلیت حاوی کانامایسین کشت داده شده و پس از رشد کلونی‌ها چند ده مورد از آن‌ها انتخاب گردیده و پس از استخراج پلاسمید واکنش PCR با پرایمرهای مشابه تکثیر قطعه بر روی آن‌ها انجام گرفت تا صرفا پلاسمیدهایی برای مراحل بعدی 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 باپلاسمید 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)



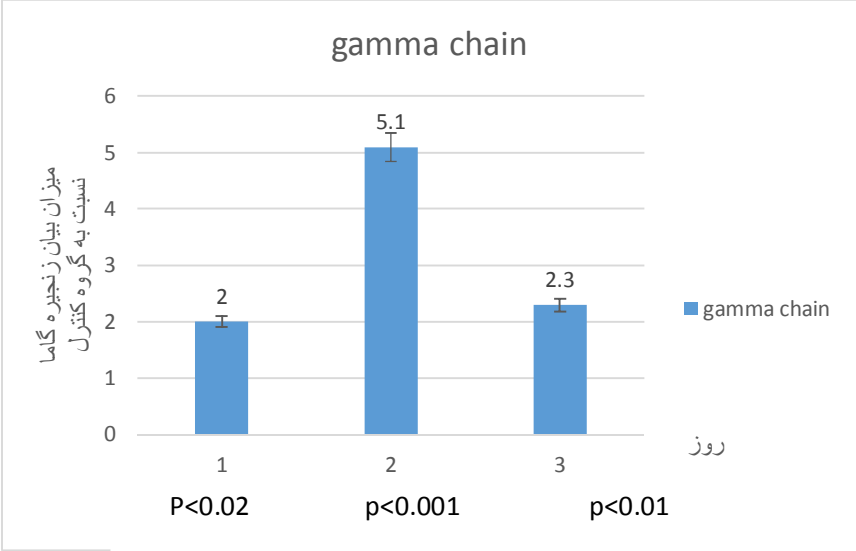
شکل ۲. سلول k-562 بعد از انتقال پلاسمید زیر میکروسکوپ فلورسانس با بزرگ‌نمایی 40X(راست) سلول‌های k-562 بعد از ترانسفکشن زیر میکروسکوپ نوری 40X(چپ)

ارزیابی تاثیر افزایشی miR-940 بر سلول K-562

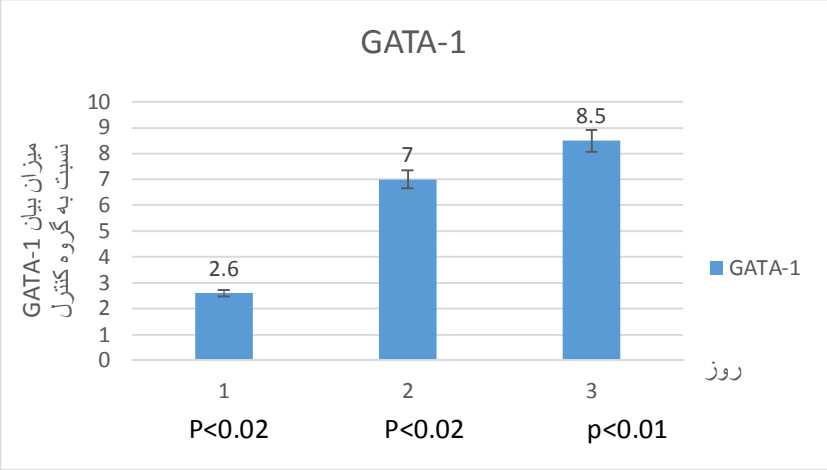
جهت اطمینان از عملکرد کلون ساخته شده و بررسی پروفایل کلون سنتز شده در روز های۳، ۷ و۱۴ با کیت Stratagen واکنش Real Time PCR انجام شد و بیان miR-940 نسبت به نمونه کنترل بررسی شد که به ترتیب حدود ۲، ۴، ۶، ۹ و ۴، ۱۹ برابرشده بود.

تغییرات بیان زنجیره‌های گاما، بتا و GATA-1

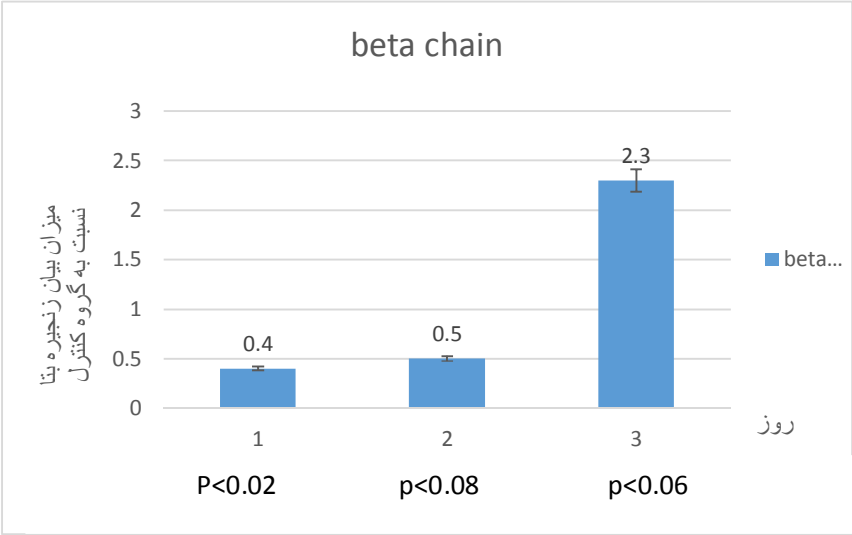
پس از انتقال کلون به رده سلولی K562 در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ جداسازی RNA از نمونه‌ها صورت گرفت و سپس سنتز cDNA انجام شد. به دلیل بیان زنجیره‌های هموگلوبین و هم‌چنین فاکتور GATA1 توسط سلول‌های K562 با روش RT-PCR نمی‌توان تاثیرات افزایشی یا کاهشی ناشی از miRNA را مشاهده کرد. به همین منظور با مطالعه‌ای که روی زنجیره‌های مختلف هموگلوبین با روش Real Time PCR انجام شد، بیان زنجیره‌ی گاما و فاکتور GATA-1 افزایش قابل توجهی داشت (شکل۳ نمودارهای الف و ب و ج).



نمودار الف



نمودار ب

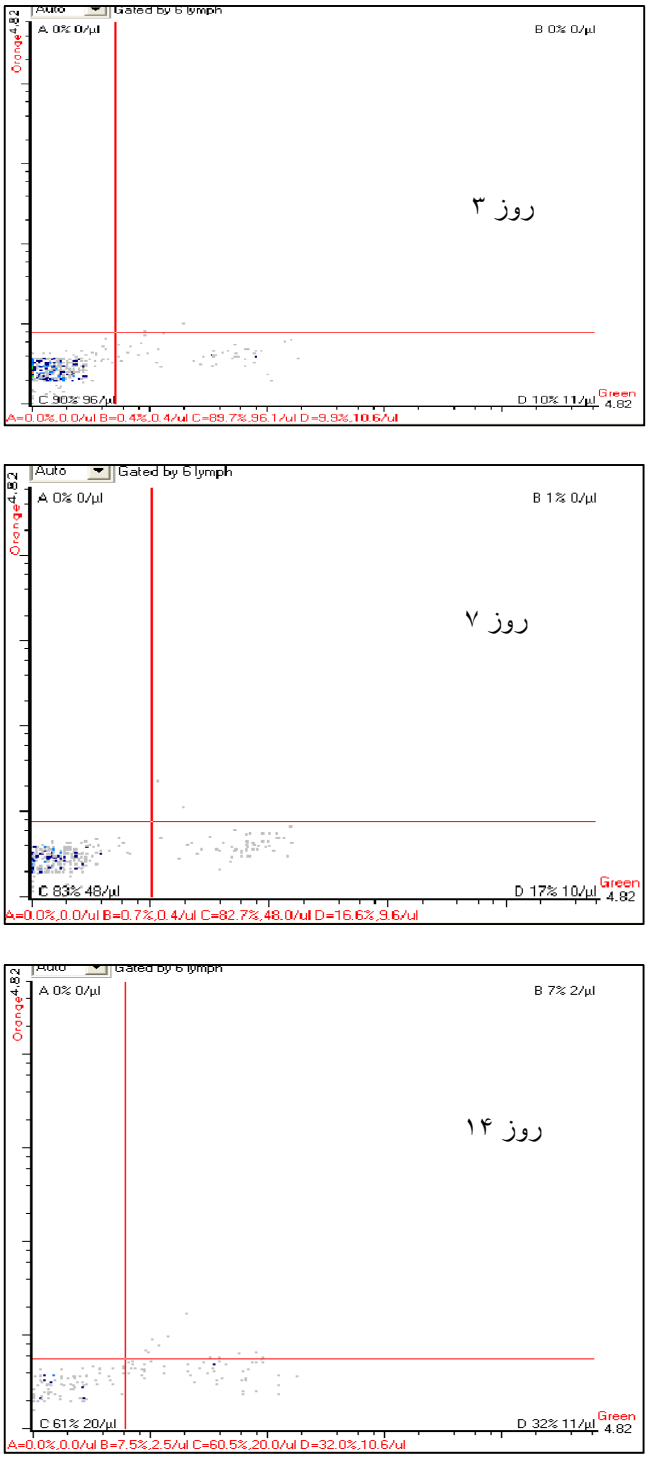


نمودار ج

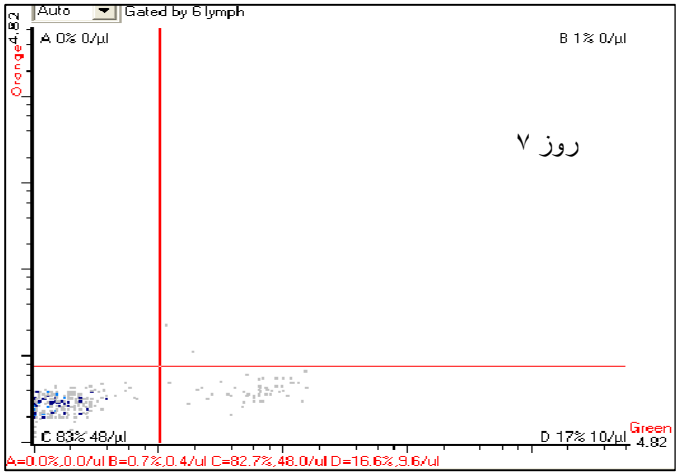
شکل۳. تاثیر miR-940 بر روی زنجیره‌های گاما (نمودار ب) و بتا هموگلوبین (نمودار ج) و فاکتور GATA-1 (نمودار الف) در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از انتقال ژن هدف به داخل سلول k-562

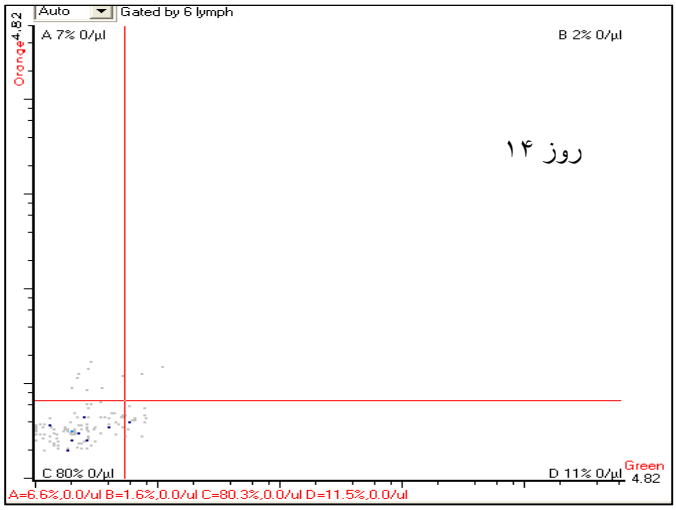
نتایج فلوسیتومتری

نمونه‌های 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 اریتروئیدی (CD71 و CD235a) آنالیز شد و با سلول‌های کنترل مقایسه گردید. بیان مارکر CD71 و CD235a در روز سوم وهفتم و چهاردهم در زیر نشان داده شده است (شکل۵-۴).



شکل۴. نتایج فلوسیتومتری مارکر CD71 به ترتیب از بالا به پایین در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از انتقال پلاسمید





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 SCAوβ-تالاسمی، شایع‌ترین عامل بیماری‌های ژنتیکی در دنیا و یکی از مهم‌ترین عامل مرگ و میر به حساب می‌آیند(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 می‌شود. در حال حاضر رایج‌ترین درمان این بیماران القاگرهای هموگلوبین F می‌باشد که به واسطه داروهای مختلفی انجام می‌شود که خود این داروها در دراز مدت دارای عوارض سایتوتوکسیک می‌باشند(۱۳). بر این اساس مسیرهای درمانی جدیدی برای القاء هموگلوبین F مورد توجه قرار گرفته است که براساس هدف قرار دادن ملکول‌هایی است که در تنظیم بیان هموگلوبین F و جابه جائی یا (تعویض کلاس)آن به زنجیره بتا-گلوبین نقش دارند و هم‌چنین ملکول‌هایی که در مکانیسم‌های تنظیمی به واسطه‌ی داروها نقش دارند. یکی از این ملکول‌ها RNAهای ریز یا miRNAs هستند که به عنوان یک هدف ملکولی جدید برای القاء بیان هموگلوبین مورد توجه قرار گرفته‌اند. سلول‌های K-562 مورد مطالعه به دو گروه کنترل و تست با شمارش سلولی یکسان تقسم شدند و گروه تست با پلاسمید حاوی miR-940 تیمار شدند. سلول‌های هر دوگروه در روزهای سوم و هفتم و چهاردهم از نظر افزایش بیان هموگلوبین با تکنیک Real Time-PCR، شاخص‌های اریتروئیدی به وسیله فلوسیتومتری مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. با توجه به این‌که سلول K-562 به طور اولیه بیان ضعیف از هموگلوبین‌ها را نشان می‌دهد، باید میزان بیان این هموگلوبین‌ها با گروه کنترل مقایسه می‌شد. ابتدا بیان pre- miR-940 در سلول‌های 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 وکتور کلون شده را نیز تایید می‌کند.

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 معنی‌دار بوده($P<0.05$). اما در روز ۱۴ یک کاهش در بیان زنجیزه گاما نسبت به دو زمان قبلی مشاهده گردید. در واقع به دلایلی miR بیان آن را سرکوب کرد.البته با توجه به نتایج بالا می‌توان 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 می‌گیرد بیان آن کاهش پیدا می‌کند که تا حدودی با این نتایج ما هم خوانی دارد. هم‌چنین در مورد بیان فاکتور ،GATA-1 در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ یک افزایش بیان مشاهده شد. البته در روزهای ابتدائی کم و در انتها افزایش زیاد مشاهده شد.که این افزایش خطی و از نظر آماری معنی‌دار بود($P<0.05$). به طور کلی GATA-1 فاکتور اصلی دراریتروپوئز نرمال و بلوغ اریتروئیدی می‌باشد که در تمایز نهایی و در مراحل انتهایی به طور کلی افزایش می‌یابد و هم‌چنین 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 هم‌چنین افزایش آن و کاهش بیان زنجیزه گاما می‌تواند توجیهی برای تعویض کلاس باشد. در مورد زنجیره بتا در روزهای ذکر شده افزایش قابل توجه و معنی‌داری 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. شاخص‌های مذکور افزایش چشم‌گیری در گروه تست نسبت به گروه کنترل نشان دادند. در روز ۳ میزان CD71=10% و CD235a=3% در روز ۷ میزان CD71=29% وCD235a=11% و در روز ۱۴ میزانCD71=32% وCD235a=25% بود.

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

اریتروپوئز نرمال بیان آنها افزایش پیدا می‌کند. با توجه به نتایج فوق و نتایج مربوط به بیان miR-940 در روزهای ذکر شده می‌توان گفت که در طول تمایز با افزایش بیان miR-940 بیان این دو مارکر هم یک افزایش خطی و معنی‌دار 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 می‌گیرند که نهایت باعث این تمایز می‌شود. اما می‌توان احتمالاتی داد. یکی از این ژن‌های هدف TPO می‌باشد.TPO به عنوان یک فاکتور رشد اصلی مگاکاریوسیتی می‌باشد 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 مطالعه‌ای که علیزاده و همکارانش در راستای القای تمایز انجام دادند نشان داده شد که تفکر القای تمایز با استفاده از microRNA می‌تواند به تنهایی جواب‌گو باشند(۱۷).

نتیجه‌گیری

توانایی miRNA ها در القاء تمایز به سمت یک رده خاص و یا توانایی آن‌ها در بیان ژن‌های خاصی مانند ژن‌های هموگلوبین‌ها نقش بالقوه آنها را در ژن درمانی یاد آور می‌سازد. ناگفته پیداست که بیماری‌های ناشی از اختلال در گلبول‌های قرمز دسته عظیمی از بیماری‌های انسان را به خود اختصاص داده است که درصد عظیمی از آن‌ها تنها ناشی از یک جهش یا بد تنظیمی است. miRNAها 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 مولکول‌های کوچک و توانمند در پزشکی و مهندسی بافت به شایسته‌ترین نحو بهره ببرد.

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-Belkhodja 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.

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