Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Mahdavi Anari, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.*
doi: 10.34172/mj.2022.018
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Expression of circulatory microRNA-155 in non-Hodgkin lymphomas and rheumatoid arthritis

In Press

Seyed Rasool Mahdavi Anari[1], Babak Kheirkhah[1,2*], Kumarss Amini[3], Farzin Roozafzai[4]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
[3]Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
[4]Digestive Diseases Research Institute, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 6 Sep 2021
Accepted: 7 Dec 2021
ePublished: 7 May 2022

Keywords:
Rheumatoid arthritis, Lymphoma Non-Hodgkin, MicroRNA-155, Polymerase chain reaction

Abstract

Background. Micro-ribonucleic acids (miRs) take part in post-transcriptional gene regulation. MiR-155 regulates hematopoiesis, oncogenesis, and immunologic and inflammatory processes. We investigated the expression levels of miR-155 in sera of patients with Burkitt's lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and rheumatoid arthritis.

Methods. In this cross-sectional observation, we used real-time polymerase chain reaction to evaluate expression of miR-155 in sera of 92 Iranian adults who were healthy or had Burkitt's lymphoma, DLBCL, or rheumatoid arthritis. The relative quantification of gene expression was calculated in terms of cycle threshold values (Ct). We conducted Pearson's and Spearman's correlations, Fisher's exact test, and one-way analysis of variance and Games-Howell post-hoc test, with the level of significance at 0.05.

Results. The expression of miR-155 was independent of sex and age in each study group. In comparison with healthy subjects (-ΔCt:-2.29 ±SD: 1.92), miR-155 expression increased in DLBCL (2.49 ±1.01), and rheumatoid arthritis (2.30 ±1.34) patients, but did not change in adults with Burkitt's lymphoma (-1.29 ±2.11).

Conclusion. MiR-155 was significantly elevated in the sera of patients with DLBCL, and rheumatoid arthritis. Further studies with larger sample sizes are needed to assess the diagnostic, and therapeutic applications of miR-155 in these patients.

Practical Implications. The expression of miR-155 increases in sera of patients suffering from DLBCL, and rheumatoid arthritis. The expression of miR-155 was independent of sex and age of patients in this study.

How to cite this article: Mahdavi Anari S R, Kheirkhah B, Amini K, Roozafzai F. Expression of circulatory microRNA-155 in non-Hodgkin lymphomas and rheumatoid arthritis. *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* doi: 10.34172/mj.2022.018. Persian.

Extended Abstract

Background

Cancers and chronic inflammatory diseases impose a considerable burden on individuals and populations. MicroRNA-155 (miR-155) post-transcriptionally regulates hematopoiesis, oncogenesis, and inflammation. We investigated the expression levels of miR-155 in sera of patients with

*Corresponding author; Email: babakkheirkhah@yahoo.com
© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Burkitt's lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and rheumatoid arthritis.

Methods

In this cross-sectional observation, we used real-time polymerase chain reaction to evaluate expression of miR-155 in sera of Iranian adults who were healthy or had Burkitt's lymphoma, DLBCL, or rheumatoid arthritis. Of 121 collected whole blood samples, 14 were excluded from the study because the participants were younger than 18 years, had history of other malignancies, underwent treatments for cancer, and/or the specimens were insufficient or inappropriate. We extracted total RNA from buffy coat layer of the blood sample. The concentration of the extracted RNA was determined by optic absorbance at 260 nm. All samples also showed distinct 28s rRNA and 18s rRNA bands in agarose gel (1.2% agarose, and ethidium bromide) electrophoresis, implying the quality and integrity of the eluted RNA. We adapted an original sequence from the literature and designed a stem-loop forward primer for miR-155 gene amplification. Some base-pairs of the original stem were substituted in order to optimize the melting temperature. Nucleotides were also added to the 5′ end to make the primer more specific. Real-time polymerase chain reaction was carried out through the following thermocycling conditions: polymerase activation at 95 °C for 15 seconds, followed by 45 cycles of denaturation at 94 °C for 15 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds, and extension at 65 °C for 35 seconds. Melting curve analysis was performed between 55 °C and 95 °C with increments of 0.5 °C every three seconds. U6B small nuclear RNA (RNU6B) gene was used as an endogenous control. The relative quantification of gene expression was calculated in terms of cycle threshold values (Ct) by subtracting the Ct values of RNU6B from the Ct values of miR-155. We conducted Pearson's and Spearman's correlations, Fisher's exact test, and one-way analysis of variance and Games-Howell post-hoc test, with the level of significance of 0.05.

Results

Of 107 included samples, 15 were inappropriate for processing and analysis. We finally analyzed the data of 92 participants 59 of whom (64.1%) were men. The expression of miR-155 was independent of sex and age in the study groups; the coefficients [95% confidence interval] of Pearson's correlation between age (1-year increments) and miR-155 expression in Burkitt's lymphoma, DLBCL, and rheumatoid arthritis patients were 0.21 [-0.16–0.56], 0.35 [-0.01–0.71], and -0.18 [-0.51–0.16], respectively. The coefficients [95% confidence interval] of Spearman's correlation between female sex and miR-155 expression in Burkitt's lymphoma, DLBCL, and rheumatoid arthritis patients were 0.30 [-0.04–0.64], -0.06 [-0.41–0.30], and -0.30 [-0.60–0.03], respectively. In comparison with healthy participants (-ΔCt: -2.29 [±standard deviation: 1.92]), miR-155 expression increased (P<0.001) in DLBCL (2.49±1.01), and rheumatoid arthritis (2.30 ±1.34) patients, while it did not change (P=0.431) in adults with Burkitt's lymphoma (-1.29 ±2.11). The expression of miR-155 in DLBCL and rheumatoid arthritis patients was statistically the same (P=0.930).

Conclusion

According to our observation, miR-155 expression increased in the sera of patients suffering from DLBCL, or rheumatoid arthritis. The expression was independent of sex and age in this study. Further studies with larger sample sizes are needed to assess the diagnostic and therapeutic applications of miR-155 in these patients.

مهدوی اناری و همکاران. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*.
doi: 10.34172/mj.2022.018
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

بیان میکرو RNA-۱۵۵ در سرم مبتلایان به لنفوم‌های غیرهوجکین و آرتریت روماتویید

سید رسول مهدوی اناری[۱]، بابک خیرخواه[۲*]، کیومرث امینی[۳]، فرزین روزافزای[۴]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
[۳] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
[۴] پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵
پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۶
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۲/۱۷

کلیدواژه‌ها:
آرتریت روماتویید، لنفوم غیرهوجکین، میکروRNA-۱۵۵، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

چکیده

زمینه. میکروRNAها (miRs) در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارند. miR-155 در تنظیم فرآیندهای متعددی مانند خون‌سازی، ایمنی، سرطان‌زایی و التهاب نقش دارد. این مطالعه با هدف بررسی بیان miR-155 در سرم مبتلایان به لنفوم بورکیت، لنفوم سلول B بزرگ منتشر(DLBCL) و آرتریت روماتویید اجرا شده‌است.

روش کار. در این مشاهده مقطعی، بیان miR-155 در ۹۲ نمونه سرم از افراد سالم و یا مبتلایان به لنفوم بورکیت، DLBCL یا آرتریت روماتویید از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ارزیابی شد. بیان نسبی ژن در نمونه‌ها از طریق محاسبه اختلاف مقادیر آستانه چرخه (Ct) ژن miR-155 با ژن کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. سطح معناداری تمامی ارزیابی‌های آماری، شامل همبستگی پیرسون و اسپیرمن، آزمون دقیق فیشر، آنالیز یک‌طرفه واریانس و آزمون تعقیبی جیمز-هوول، $P<0/05$ در نظر گرفته‌شد.

یافته‌ها. بیان miR-155 ارتباطی با سن و جنس افراد نداشت. در مقایسه با افراد سالم (ΔCt: -۲۹/۲ [انحراف معیار: ±۹۲/۱]) بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL (۴۹/۲ [±۰۱/۱]) و آرتریت روماتویید (۳۰/۲ [±۳۴/۱]) افزایش یافت، ولی در مبتلایان به لنفوم بورکیت (-۲۹/۱ [±۱۱/۲]) تغییری نشان نداد.

نتیجه‌گیری. بیان miR-155 در بیماران مبتلا به DLBCL و آرتریت روماتویید افزایش می‌یابد. مطالعات بیشتر، با حجم نمونه بزرگتر، برای ارزیابی کاربردهای تشخیصی و درمانی miR-155 در این بیماران مورد نیاز است.

پیامدهای عملی. بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتویید افزایش می‌یابد. در این مطالعه، بیان miR-155 مستقل از سن و جنس مبتلایان بود.

مقدمه

میکروRNAها (miRs) مولکول‌های تک‌رشته‌ای غیرکدکننده ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتیدی هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها پس از رونویسی، از طریق تخریب mRNA یا مهار ترجمه، نقش دارند.[۱] طیف گسترده‌ای از mRNAها هدف یک miR منفرد قرار می‌گیرند و اختلال در بیان miR می‌تواند بر تکثیر، تمایز و بقای سلول اثر بگذارد.[۱] میکروRNAها در مقایسه با سایر مولکول‌های RNA، در سرم پایدارتر بوده و در مقابل تخریب آنزیمی یا شیمیایی مقاوم‌تر هستند.[۲] توالی کدکننده miR-155 در B-cell integration cluster (BIC) روی کروموزوم ۲۱ قرار دارد که به miR-155 بالغ ۲۴ نوکلئوتیدی و دارای عملکرد پردازش می‌شود.[۳] miR-155 از این نظر در میان میکروRNAها متمایز است که بیان آن توسط سیتوکین‌ها و محرک‌های ایمونولوژیک تنظیم می‌شود.[۴] این میکروRNA در فرآیندهای زیستی متعدد شامل خون‌سازی، ایمنی، التهاب، و سرطان‌زایی نقش دارد.[۴] سرطان‌ها و بیماری‌های التهابی مزمن بار (burden) قابل توجهی به جوامع وارد می‌کنند.[۵،۶] لنفوم‌های غیرهوجکین (NHLs) هفتمین علت بروز سرطان و یازدهمین علت شایع مرگ مرتبط با سرطان در جهان هستند.[۵] NHLs حدود ۳-۷ درصد از سرطان‌ها در ایران را شامل می‌شوند و به‌ترتیب پنجمین و هشتمین سرطان شایع در مردان و زنان ایرانی هستند.[۷] افزایش سریع در میزان بروز NHLs سبب افزایش بار ناشی از

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: babakkheirkhah@yahoo.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

سرطان شده است. لنفوم بورکیت نوعی از NHL با سرعت رشد زیاد است و لنفوم سلول B بزرگ منتشر (DLBCL) شایع‌ترین نوع NHL در بالغین است که حدود ۴۰ درصد از تومورهای لنفوییدی را شامل می‌شود.[۳] آرتریت روماتویید یک بیماری التهابی خودایمنی مزمن، با بروز و شیوع افزایش یابنده - به‌ویژه در شرق مدیترانه - است که بار بسیاری را به فرد و جمعیت تحمیل می‌کند.[۶]

این مطالعه با هدف ارزیابی سطح بیان miR-155 در سرم مبتلایان به سرطان‌های خونی (DLBCL و لنفوم بورکیت) و بیماری‌های التهابی (آرتریت روماتویید) اجرا شده‌است.

روش کار

این مشاهده مقطعی روی بیان miR-155 در بالغین مبتلا به DLBCL، لنفوم بورکیت یا آرتریت روماتویید در سال ۱۳۹۹ در تهران اجرا شده است. حجم نمونه حداقلی ۱۰۰ نفر برای سنجش بیان miR-155 با فاصله اطمینان ۹۵ درصد و قدرت ۸۰ درصد، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Sample size} = \left(\left(\frac{Z_{1-\alpha/2}}{d}\right) \times \text{Standard Deviation}\right)^2$$

α: 0.05, $Z_{1-\alpha/2}$: 1.96, d: 0.2, Standard Deviation: 1 (فرضی)

جمع‌آوری نمونه‌های خون: با مرور مدارک پزشکی و گزارش‌های یافته‌های پاتولوژی در بایگانی آزمایشگاه‌های هیستوپاتولوژی شهر تهران، اطلاعات مرتبط با تشخیص بیماری، سابقه درمانی، سن و جنس افراد جمع‌آوری شد. پس از مرور اطلاعات، نمونه‌های خون افرادی که DLBCL، لنفوم بورکیت یا آرتریت روماتویید آن‌ها توسط هیستوپاتولوژی و سرولوژی تایید شده بود، در این مطالعه ارزیابی شد. همچنین نمونه‌های خون افراد به ظاهر سالم یا مبتلایان به بیماری‌هایی غیر از سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی و التهابی در این مطالعه بررسی شدند. تصویر ۱ نحوه جمع‌آوری نمونه و مراحل انجام مطالعه را نشان می‌دهد. معیارهای خروج از مطالعه شامل سن کمتر از ۱۸ سال، سابقه ابتلا به سرطان‌های دیگر، سابقه درمان سرطان (شیمی درمانی، رادیوتراپی، ژن‌تراپی) و مقادیر ناکافی نمونه بود.

در نهایت، ۱۰۷ نمونه خون کامل در لوله‌های اتیلن-دیامین-تتراستیک اسید از آزمایشگاه‌های هیستوپاتولوژی سطح شهر تهران جمع‌آوری شدند. اگرچه تمامی آزمایشگاه‌های یادشده از اصول اخلاقی و پروتکل‌های استاندارد پیروی می‌کردند، در صورت وجود ایراد اخلاقی و قانونی، مانند عدم کسب رضایت‌نامه آگاهانه، نمونه از مطالعه خارج می‌شد.

پس از جمع‌آوری، ۵ میلی‌لیتر از هر نمونه خون به مدت ۲۰ دقیقه و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی-گراد) سانتریفیوژ شد. سپس لایه بافی‌کوت به کمک پیپت پاستور یک‌بار مصرف (آریان تجهیز، تهران، ایران) جدا و در میکروتیوب-های ۲۰۰ میکرولیتری (شرکت اپندورف، هامبورگ، آلمان) الیکوت شده و تا استفاده بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA: برای استخراج توتال RNA، محلول RNX-Plus (سیناژن، تهران، ایران) به مدت یک دقیقه با محتویات میکروتیوب ورتکس و مخلوط شده و ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. برای جداسازی، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب افزوده شد. میکروتیوب یک دقیقه تکان داده شده و سپس ۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی غنی از RNA، به دقت جدا و در میکروتیوب جدیدی الیکوت شد. اتانول ۱۰۰ درصد هم‌حجم به میکروتیوب جدید اضافه شده و به مدت یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا RNA ته‌نشین شود. سپس محتویات میکروتیوب به مدت ۴۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. لایه رویی دور ریخته شد و رسوب ته لوله با افزودن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و ورتکس کردن دوباره معلق شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی دور ریخته شده و رسوب ته لوله به مدت ۱۵ دقیقه در معرض هوای آزاد قرار گرفت تا خشک شود. در نهایت رسوب RNA در ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز معلق شده و تا استفاده بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئین‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر بهترین جذب نوری را دارند. جذب نوری بالا در طول موج ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده آلودگی با بافرهای استخراج RNA و یا سایر مواد ارگانیک است. بنابراین جهت کنترل کیفی و سنجش خلوص و غلظت RNA استخراج شده، جذب نوری نمونه-ها در طول موج‌های یاد شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS ND-1000(شرکت نانودراپ تکنولوجیز، ویلمینگتون، دلاویر، آمریکا) خوانده شده و نسبت جذب نوری در این طول موج‌ها (۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰) محاسبه شد. همچنین الکتروفورز تمامی نمونه‌ها روی ژل آگارز (آگارز ۲/۱ درصد و اتیدیوم

بروماید) نشان‌دهنده دو باند مشخص 28s rRNA و 18s rRNA بود که بیانگر کیفیت و خلوص RNA استخراج شده است.

طراحی پرایمر: در این مطالعه، برای تکثیر ژن miR-155 از یک پرایمر پیشرو با ساختار ساقه و حلقه استفاده شد. به‌عنوان یک قانون کلی، توالی و طول این پرایمر باید تا حد امکان با توالی و طول miR-155 یکسان باشد. ساختار اولیه پرایمر miR-155 از متون استخراج شد (5′-TGCTAATCGTGATAGGGG-3′).[8] برای افزایش طول، چند نوکلئوتید به قسمت حلقه اضافه شد. پرایمری با دمای ذوب بالا مقادیر کمتری از محصول نهایی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reaction (PCR)) تولید می‌کند. از سوی دیگر، دمای ذوب پایین پرایمر سبب غیراختصاصی شدن محصولات PCR می‌شود. از این رو، چند جفت باز در قسمت ساقه نیز تغییر داده شدند تا دمای ذوب از ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد به ۸۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافته و پرایمر برای تولید بیشترین مقادیر محصولات اختصاصی در PCR بهینه شود. همچنین، برای اختصاصی‌تر شدن پرایمر، نوکلئوتیدهایی به انتهای ′۵ افزوده شد (5′-GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGC ATACGACAACCCCT-3′). برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار جین رانر نسخه ٦ (شرکت نرم‌افزاری هستینگز، آماریلو، تگزاس، آمریکا) استفاده شد. برای تکثیر ژن U6B small nuclear RNA (RNU6B) از کیت human RNU6B miScript Primer Assay (کیاژن، هیلدن، آلمان) استفاده شد.

سنتز cDNA: مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ (شرکت نانودراپ تکنولوجیز، ویلمینگتون، دلاویر، آمریکا) از میکروتیوب حاوی مخلوط معلق برداشته و در چهار میکروتیوب جدید الیکوت شد. سپس پرایمر معکوس عمومی (5′-GAGCAGGGTCCGAGGT-3′)، پرایمر پیشرو RNU6B (5′-CGGTTTAATGCTAATCGTGA-3′) و پرایمر پیشرو ساقه و حلقه miR-155 (هر کدام به حجم ۱/۵میکرولیتر و غلظت ۱۰ پیکومولار) به هر میکروتیوب اضافه شدند. با افزودن آب بدون نوکلئاز، حجم مخلوط به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. برای دناتوره شدن دورشته‌ای‌های پرایمر، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند تا اتصال پرایمر به RNA الگو تسهیل شود. سپس بافر فرمنتاس×5، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس MMLV و ۲ میکرولیتر dNTP (همگی ساخت شرکت فرمنتاس: ترموفیشر ساینتیفیک، والتهام، ماساچوست، آمریکا) به هر میکروتیوب افزوده شد. یک سیکل PCR معکوس (reverse PCR) طبق شرایط دمایی زیر، به‌ترتیب انجام گرفت: بر اساس دستورالعمل سازنده، برای فعال‌سازی آنزیم و انجام رونویسی معکوس، میکروتیوب‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، و ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در ادامه و برای غیرفعال کردن آنزیم ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با مشاهده یک نوار واضح در جایگاه درست طولی (۲۷ نوکلئوتید) منطبق با نشانگر (ladder)، در الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، از کیفیت cDNA اطمینان حاصل شد. سپس میکروتیوب‌ها تا استفاده بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

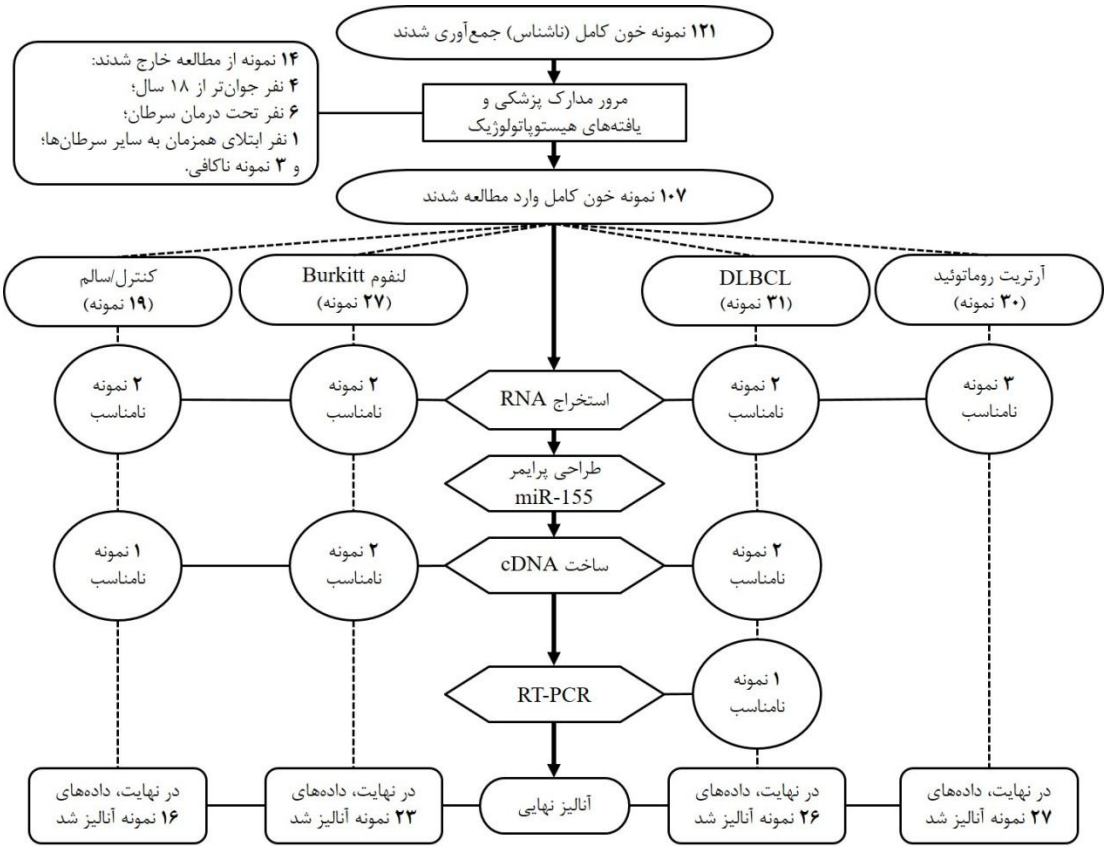
PCR زمان واقعی: PCR زمان واقعی (real-time PCR) با استفاده از کیت SYBR® Premix Ex Taq™ PCR kit (شرکت تاکارا بیو، کوساتسو، شیگا، ژاپن) و با کمک دستگاه Rotor-Gene 6000 HRM Real-Time PCR Machine (کوربت، مورت‌لیک، استرالیا) انجام شد. پرایمرهای پیشروی miR-155 (5′-GAGGATGTATAATCGTAATTGT-3′) و RNU6B به همراه پرایمر معکوس عمومی (هر کدام به حجم ۰/۵ میکرولیتر و غلظت ۱۰ پیکومولار)، و cDNAهای الگوی miR-155 و RNU6B (هر کدام ۲ میکرولیتر) به میکروتیوب اضافه شدند. حجم هر میکروتیوب با افزودن آب دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. پس از قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه برای فعال‌سازی پلیمراز و بر اساس دستورالعمل سازنده، ۴۵ سیکل PCR زمان واقعی طبق شرایط دمایی زیر، به ترتیب انجام گرفت: ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره کردن، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و ۳۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای طویل‌سازی. هر ۳ ثانیه یک‌بار، منحنی ذوب در بازه ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد. منحنی ذوب تمامی نمونه‌ها دارای یک نقطه ذوب بیشینه (قله) بود که بیانگر خلوص محصولات PCR است. برای کنترل منفی از نمونه فاقد الگو استفاده شد. از ژن RNU6B به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای کمی‌سازی نسبی بیان ژن miR-155 از محاسبه اختلاف مقادیر آستانه چرخه (Ct) برای ژن‌های miR-155 و کنترل داخلی (RNU6B) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: یافته‌های مرتبط با تشخیص بیماری، سن، جنس و بیان miR-155 به کمک آمار توصیفی (توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار) گزارش شدند. برای مقایسه گروه‌های مختلف مطالعه از آزمون کای اسکوئر و آزمون دقیق فیشر، آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی جیمز-هوول

استفاده شد. ارتباط بیان miR-155 با سن و جنس، به‌ترتیب از طریق همبستگی پیرسون و اسپیرمن ارزیابی شد. سطح معنی‌داری تمامی آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی آنالیزها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ (شرکت IBM، آرمونک، نیویورک، آمریکا) انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه از سوی کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جیرفت تایید شده‌است (شماره ارجاع: IR.JMU.REC.1400.014). مجریان طرح متعهد به اصول بیانیه هلسینکی بوده و هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند. تمامی اطلاعات هویتی افراد محفوظ است. با توجه به ماهیت مطالعه، آسیبی به جمعیت مورد مطالعه وارد نمی‌شود. در این مطالعه روی اطلاعات کدگذاری شده و نمونه‌های ناشناس کار شده است. تمامی آزمایشگاه‌های ارایه‌دهنده نمونه‌ها و اطلاعات، از اصول اخلاقی پژوهش و پروتکل‌های استاندارد در تهیه و توزیع نمونه‌ها پیروی کرده‌اند. دسترسی مجریان طرح به اطلاعات و نمونه‌ها تنها بر طبق توافق‌نامه انتقال نمونه‌ها امکان‌پذیر بود. اگرچه تمامی آزمایشگاه-های یاد شده از اصول اخلاقی و پروتکل‌های استاندارد پیروی می-کردند، در صورت وجود ایراد اخلاقی و قانونی،به عنوان مثال عدم کسب رضایت‌نامه آگاهانه، نمونه از مطالعه خارج می‌شد. در زمان اجرای روش‌های آزمایشگاهی، تمامی نمونه‌ها به‌عنوان نمونه‌های بالقوه عفونی در نظر گرفته‌شده‌اند. تمام مقررات ایمنی آزمایشگاه در این طرح رعایت شده‌اند.



تصویر ۱. فلوچارت مراحل اجرای طرح (cDNA: complementary DNA, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, miR-155: microRNA-155, RT-PCR: real-time polymerase chain reaction)

یافته‌ها

از ۱۰۷ نمونه خون کامل، ۱۵ نمونه برای استخراج RNA، سنتز cDNA و یا انجام PCR مناسب نبودند و اطلاعات آن‌ها وارد آنالیز نهایی نشد. از ۹۲ نمونه مطالعه شده، ۵۹ نمونه (۱/۶۴ درصد) از مردان تهیه شده بود. جدول ۱ یافته‌های دموگرافیک (سن و جنس) را در گروه‌های مطالعه نشان می‌دهد. توزیع جنس بین چهار گروه مطالعه از نظر آماری یکسان بود (P=۰/۹۱۱). همبستگی معنی‌داری بین بیان miR-155 و سن یا جنس افراد نمونه‌دهنده وجود نداشت. ضریب همبستگی پیرسون [فاصله اطمینان ۹۵ درصد] بین سن (+۱ سال) و بیان miR-155 در نمونه‌های لنفوم بورکیت، DLBCL، و آرتریت روماتویید، به‌ترتیب ۲۱/۰ [-۱۶/۰–۵۶/۰]، ۳۵/۰ [-۰۱/۰–۷۱/۰]، و -۱۸/۰ [-۵۱/۰–۱۶/۰] بود. ضریب همبستگی اسپیرمن بین جنس (جنس زن) و بیان miR-155 در نمونه‌های لنفوم بورکیت، DLBCL، و آرتریت روماتویید، به‌ترتیب ۳۰/۰ [-۰۴/۰–۶۴/۰]، -۰۶/۰ [-۴۱/۰–۳۰/۰]، و -۳۰/۰ [-۶۰/۰–۰۳/۰] بود. طبق تصویر ۲، بالاترین سطح بیان miR-155 در بیماران DLBCL (ΔCt-: ۴۹/۲ [فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۰۸/۲–۹۰/۲]) و آرتریت روماتویید (۳۰/۲ [۷۶/۱–۸۳/۲]) دیده شد. بیان miR-155 در نمونه‌های مبتلایان به لنفوم بورکیت در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم، افزایش یافته‌بود، هر چند این مشاهده از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۴۳۱). در مقایسه با نمونه‌های سالم، بیان miR-155 در نمونه‌های مبتلایان به DLBCL (P<۰/۰۰۱) و آرتریت روماتویید (P<۰/۰۰۱) افزایش یافته بود. در مقایسه با مبتلایان به لنفوم بورکیت، بیان miR-155 در مبتلایان به DLBCL (P<۰/۰۰۱) و آرتریت روماتویید (P<۰/۰۰۱) افزایش یافته بود. بیان miR-155 در مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتویید از نظر آماری تفاوتی نداشت (P=۰/۰۹۳). جزییات بیشتر در جدول ۲ ارایه شده‌اند.

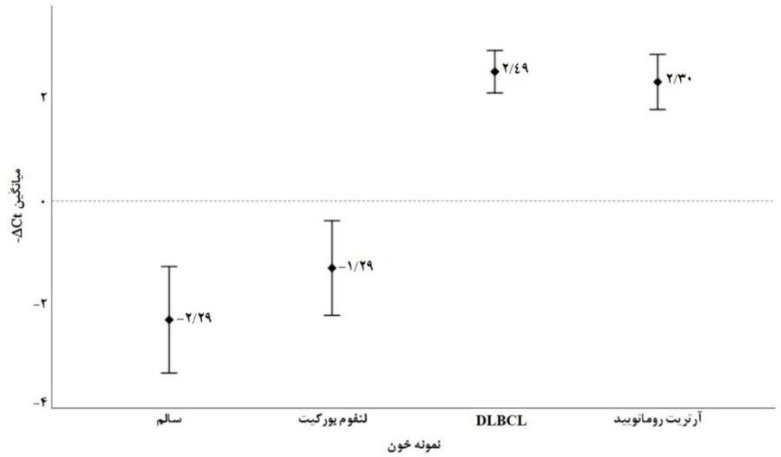
جدول ۱. یافته‌های دموگرافیک و مقادیر آستانه چرخه (Ct) ژن‌های میکروRNA-۱۵۵ و RNU6B در ۹۲ نمونه مورد مطالعه

	سالم (۱۶ نمونه)	لنفوم بورکیت (۲۳ نمونه)	DLBCL (۲۶ نمونه)	آرتریت روماتویید (۲۷ نمونه)	P
		تعداد (درصد)			
مرد	۱۰ (۵/۶۲)	۱۶ (۶/۶۹)	۱۷ (۴/۶۵)	۱۶ (۳/۵۹)	*۹۱۱/۰
زن	۶ (۵/۳۷)	۷ (۴/۳۰)	۹ (۶/۳۴)	۱۱ (۷/۴۰)	
		میانگین (±انحراف معیار)			
سن (سال)	۳۸/۵۶ (±۱۶/۱۰)	۷۸/۵۷ (±۱۵/۹)	۳۸/۶۲ (±۸۰/۸)	۳۳/۴۸ (±۱۵/۱۶)	†۰۰۱/۰>
Ct_{RNU6B}	۵۲/۱۸ (±۷۷/۵)	۰۵/۱۹ (±۳۲/۶)	۹۶/۲۲ (±۷۸/۵)	۹۴/۲۲ (±۳۷/۷)	† ۰۳۱/۰
$Ct_{miR-155}$	۸۱/۲۰ (±۶۰/۶)	۳۴/۲۰ (±۸۷/۶)	۴۶/۲۰ (±۵۵/۵)	۶۴/۲۰ (±۹۰/۶)	† ۹۹۶/۰

Ct: cycle threshold value, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, miR-155: microRNA-155, RNU6B: U6B small nuclear RNA gene.

* آزمون دقیق فیشر؛ سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.

† آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA)؛ سطح معناداری ۰/۰۵ است.



تصویر ۲. بیان نسبی (-ΔCt) میکروRNA-۱۵۵ در چهار گروه مطالعه. ΔCt از کم کردن مقادیر آستانه چرخه (Ct) کنترل داخلی از مقادیر آستانه چرخه میکروRNA-۱۵۵ در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل شد. اعداد و بازه‌ها، به ترتیب نشان دهنده میانگین ΔCt- و فاصله اطمینان ۹۵ درصد میانگین هستند. (Ct: cycle threshold, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma)

جدول ۲. مقایسه بیان نسبی miR-155 در چهار گروه مطالعه، بر اساس میانگین تفاوت ΔCt-ΔCt؛ ازکم کردن مقادیر آستانه چرخه (Ct) کنترل داخلی از مقادیر آستانه چرخه miR-155 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل شد.

	میانگین تفاوت ΔCt– (فاصله اطمینان ۹۵ درصد) [a] [*]		
	لنفوم بورکیت	DLBCL	آرتریت روماتویید
سالم	۰۰/۱ (۷۶/۰-۷۶/۲)	۷۹/۴ (۳۳/۳-۲۵/۶)	۵۹/۴ (۰۸/۳-۱۰/۶)
لنفوم بورکیت		۷۹/۳ (۴۷/۲-۱۰/۵)	۵۹/۳ (۲۱/۲-۹۶/۴)
DLBCL			۱۹/۰ (۶۷/۰-۰۶/۱)

Ct: cycle threshold value, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma

[a] اعداد از کم کردن ΔCt- ردیف‌ها از ΔCt- ستون‌ها حاصل شده‌اند.

[*] آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA)؛ آزمون تعقیبی جیمز-هوول.

بحث

در این مطالعه، بیان نسبی miR-155 در سرم مبتلایان به دو نوع لنفوم غیرهوجکین (DLBCL و لنفوم بورکیت) و یک بیماری خودایمنی التهابی (آرتریت روماتویید) ارزیابی شد. ارزیابی miR-155 در سرم می‌تواند به عنوان یک رویکرد جایگزین برای غربالگری و تشخیص این بیماران، به‌ویژه در مواقعی که استاندارد طلایی، مثلا هیستوپاتولوژی، در دسترس یا قابل اجرا نباشد، استفاده شود.[۹] این روش در مقایسه با روش‌های تشخیصی تهاجمی، مانند بیوپسی و آسپیراسیون، ارزان‌تر، کم-تهاجمی‌تر و ایمن‌تر است.[۹] مطالعات در دسترس، نتایج متفاوتی راجع به ارتباط بین بیان miRهای گوناگون مانند miR-155 و سن یا جنس افراد ارایه داده‌اند. حجم نمونه، توزیع سنی و جمعیت هدف این مطالعات متفاوت است.[۱۰] در مطالعه حاضر، ارتباطی بین بیان miR-155 و سن یا جنس افراد مشاهده نشد. بنابراین، در مواقعی که نیاز به بررسی یک جمعیت عمومی (غربالگری) یا پیگیری یک نفر بیمار (سنجش‌های مکرر، پایش وضعیت بیماری، پیگیری پاسخ به درمان) وجود دارد، می‌توان از این رویکرد استفاده کرد. بیان miR-155 در DLBCL: همانند مطالعات قبلی، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL در مطالعه حاضر افزایش یافته بود. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان miR-155 سبب کاهش سرعت آپوپتوز، افزایش تکثیر سلولی و القای مهاجرت و تهاجم سلول‌ها می‌شود.[۱۱-۱۴] برخی از سازوکارهای پیشنهادی راجع به نقش miR-155 در بروز DLBCL به شرح زیر هستند:

سیتوکین‌های التهابی و محرک‌های ایمنی با فعال‌سازی فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-κB) سبب القای بیان miR-155 می-شوند.[۱۴، ۱۵] افزایش بیان miR-155 سبب مهار بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز (pro-apoptotic)، suppressor of cytokine signaling protein 3 (SOCS3)، B-cell lymphoma protein 6 (BCL6)، هیستون‌دآستیلاز ۴ (HDAC4)، و Src homology 2-containing inositol 5′ phosphatase 1 (SHIP1) و افزایش بیان پروتئین‌های چرخه سلولی شده و متعاقب آن بقا و تکثیر لنفوسیت‌های B را افزایش داده و سبب فرار سلول از آپوپتوز می‌شود.[۱۱-۱۴] همچنین افزایش بیان miR-155 از طریق مهار عامل رونویسی PU.1 و کاهش پروتئین غشایی CD10 منجر به تشدید ویژگی تهاجمی، افزایش متاستاز و بدتر شدن پیش‌آگهی DLBCL می‌شود.[۱۵]

بیان miR-155 در لنفوم بورکیت بالغین: یافته‌های مطالعه حاضر، نتایج مطالعات پیشین را تایید کرده و نشان داد بیان miR-155 در بالغین مبتلا به لنفوم بورکیت با بیان آن در افراد سالم تفاوتی ندارد.[۱۶، ۱۷] مطالعات نشان داده‌اند که لنفوسیت‌های B در لنفوم بورکیت توانایی رونویسی و پردازش ژن BIC به miR-155 بالغ و فعال را ندارند.[۱۶] miR-155 به‌عنوان یک سرکوبگر تومور در لنفوم بورکیت عمل می‌کند. یکی از مولکول-های هدف miR-155 در لنفوسیت‌های B، activation-induced cytidine deaminase (AID) است که فعالیت آن برای تنوع ژن ایمونوگلوبولین ضروری است. مهار miR-155 سبب افزایش بیان AID و القای جهش جابجایی *Myc-Igh* ((t(8;14)) - که نشانه (hallmark) لنفوم بورکیت است - می‌شود. مطالعات روی لنفوسیت‌های B فعال نشان داده‌اند افزایش بیان miR-155 سبب مهار این جهش سرطان‌زا می‌شود.[۸، ۹، ۱۸]

بیان miR-155 در آرتریت روماتویید: همانند مطالعات گذشته، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به آرتریت روماتویید در مطالعه حاضر افزایش یافته‌بود.[۱۹، ۲۰] مطالعات نشان داده‌اند miR-155 برای نمو لنفوسیت‌ها و ایجاد ایمنی سلولی و هومورال ضروری است و کمبود آن سبب کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌شود.[۳، ۴] لنفوسیت‌های B در پاسخ به محرک-های التهابی، بیان miR-155 را افزایش می‌دهند که منجر به تمایز لنفوسیت B و تولید آنتی‌بادی می‌شود.[۲۱، ۲۲] اختلال در تنظیم فعالیت لنفوسیت‌های T نقشی اساسی در بیماری‌های خودایمنی مانند آرتریت روماتویید ایفا می‌کند.[۲۳] افزایش بیان miR-155 از طریق افزایش غیرمستقیم سیتوکین‌های التهابی (مانند TNFα و اینترلوکین ۱)، تمایز لنفوسیت‌های T و فعال-سازی ماکروفاژها و لنفوسیت‌های کمکی (helper T-cell 1 and 17) التهاب مفصلی را تشدید می‌کند.[۱۲، ۲۴، ۲۵] از سوی دیگر، مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که miR-155 در سازوکار یک بازخورد

منفی در مسیر پیام‌رسانی toll-like receptor و اینترلوکین ۱ (TLR/IL-1) دخیل است و بیان سیتوکین‌های التهابی و ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP1, MMP3) و مسیر پیام‌رسانی Janus kinase and signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT3) و اینترلوکین ۶ را در فیبروبلاست‌های سینوویال مهار کرده و منجر به مهار آبشارهای التهابی و کاهش تخریب بافتی ناشی از التهاب مفصل می‌شود.[۱۹، ۲۰] بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که بیان miR-155 در مبتلایان به آرتریت روماتویید، از یک سو سبب فعال شدن سلول‌های ایمنی و تشدید التهاب شده و از سوی دیگر از سلول‌های مفصلی در برابر آسیب ناشی از التهاب محافظت می‌کند و متعاقب آن سبب مزمن شدن بیماری می‌شود. مطالعات قبلی، نشان‌دهنده ارتباط و همبستگی بین آرتریت روماتویید و لنفوم بوده‌اند. تنظیم بیان miR-155 می‌تواند نقشی محوری در برقراری ارتباط بین التهاب و بدخیمی داشته باشد.[۳، ۲۰، ۲۶، ۲۷]

محدودیت‌هاي طرح: حجم کم نمونه مطالعه شده، محدودیت روش‌های آزمایشگاهی (PCR)، خطای مشاهده‌گر در تعیین تشخیص بیماری، خطای ثبت و بازخوانی اطلاعات، وجود بیماری‌های همراه و سایر عوامل مخدوش‌کننده، نتایج این مطالعه را محدود می‌کنند. با توجه به این که برخی از روش‌های آزمایشگاهی به صورت دستی و بدون استفاده از کیت‌های پیش‌ساخته اجرا شده‌اند، احتمال خطا و از دست رفتن نمونه‌ها افزایش می‌یابد. استفاده از مدارک چاپی و الکترونیک، کالیبره کردن ابزارهای اندازه‌گیری با کنترل‌های منفی و مثبت، هماهنگ‌سازی گروه‌های مطالعه بر اساس سن و جنس، استفاده از کنترل داخلی، و استفاده از روش‌های آماری متناسب با توزیع متغیرها از رویکردهای کاهش محدودیت مطالعه است. اجرای مطالعات آینده‌نگر و مداخله‌های بالینی می‌تواند نتایج معتبرتر و پایاتری در پی داشته‌باشد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج مطالعه حاضر، در مقایسه با افراد سالم، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتویید افزایش یافت، ولی تغییر معنی‌داری در سرم بالغین مبتلا به لنفوم بورکیت مشاهده نشد. بررسی‌های مولکولی و کارآزمایی-های بالینی بیشتری برای ارزیابی کاربردهای تشخیصی و درمانی miR-155 در سرطان خون یا بیماری‌های خودایمنی و التهابی لازم است.

قدردانی‌ها

این طرح به عنوان پایان‌نامه دوره دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی نویسنده اول در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان ارایه شده است. نویسندگان از تمامی کارکنان آزمایشگاه و همکاران دانشگاهی که جمع‌آوری نمونه‌ها و اجرای مطالعه را تسهیل کردند، تشکر می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

نویسندگان معیارهای کمیته بین‌المللی سردبیران نشریات پزشکی را رعایت کرده‌اند. سید رسول مهدوی اناری و بابک خیرخواه مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه، کیومرث امینی و فرزین روزافزای مشاوره آماری و روش پژوهش، سید رسول مهدوی اناری نمونه‌گیری و اجرای پژوهش، سید رسول مهدوی اناری و فرزین روزافزای تحلیل داده‌ها، تفسیر نتایج و تهیه پیش‌نویس اولیه مقاله را عهده داشتند. تمامی مولفان متن نهایی مقاله را بازبینی و تایید کرده‌اند.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

دسترس پذیری داده ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارایه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این طرح با شماره IR.JMU.REC.1400.014 از سوی کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جیرفت تایید شده است.

تعارض منافع

مولفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

References

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell. 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
2. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK. Pogosova-Agadj anyan. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105:10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105
3. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2009 Jun 1;1792(6):497-505. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013
4. Mashima R. Physiological roles of miR-155. Immunology. 2015 Jul;145(3):323-33. doi: 10.1111/imm.12468
5. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncology. 2017;3(4):524-48. doi: 10.1001jamaoncol.2016.5688
6. Moradi-Lakeh M, Forouzanfar MH, Vollset SE, El Bcheraoui C, Daoud F, Afshin A, et al. Burden of musculoskeletal disorders in the Eastern Mediterranean Region, 1990–2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. Annals of the Rheumatic Diseases. 2017 Aug 1;76(8):1365-73. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210146
7. Monabati A, Safaei A, Noori S, Mokhtari M, Vahedi A. Subtype distribution of lymphomas in South of Iran, analysis of 1085 cases based on World Health Organization classification. Annals of hematology. 2016 Mar;95(4):613-8. doi: 10.1007/s00277-016-2590-5
8. Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, et al. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. Annual review of genetics. 2015 Nov 23;49:213-42. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092023
9. Fernandez-Mercado M, Manterola L, H Lawrie C. MicroRNAs in lymphoma: regulatory role and biomarker potential. Current Genomics. 2015 Oct 1;16(5):349-58. doi: 10.2174/1389202916666150707160147
10. Meder B, Backes C, Haas J, Leidinger P, Stähler C, Großmann T, Vogel B, Frese K, Giannitsis E, Katus HA, Meese E. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. Clinical chemistry. 2014 Sep 1;60(9):1200-8. doi: 10.1373/clinchem.2014.224238
11. Li XD, Li XM, Gu JW, Sun XC. MiR-155 regulates lymphoma cell proliferation and apoptosis through targeting SOCS3/JAK-STAT3 signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017;21(22):5153-9. doi: 10.26355/eurrev_201711_13832
12. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D . Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106(17):7113-8. doi: 10.1073/pnas.0902636106
13. Sandhu SK, Volinia S, Costinean S, Galasso M, Neinast R, Santhanam R, et al. MiR-155 targets histone deacetylase ε (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Emu-miR-155 transgenic mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(49):20047-52. doi: 10.1073/pnas.1213764109
14. Ranganath P. MicroRNA-155 and its role in malignant hematopoiesis. Biomark Insights 2015;10:95-102. doi: 10.4137/BMI.S27676
15. Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. J Biol Chem. 2011;286(3):1675-82. doi: 10.1074/jbc.M110.177063
16. Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen BJ, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes Cancer 2006;45(2):147-53. doi: 10.1002/gcc.20273
17. Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Bouwman E, et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. Oncogene 2007;26:3769-76. doi: 10.1038/sj.onc.1210 147
18. Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, Robbiani DF, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. Immunity 2008;28(5):630-8. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.002

19. Migita K, Iwanaga N, Izumi Y, Kawahara C, Kumagai K, Nakamura T, et al. TNF-alpha-induced miR-155 regulates IL-6 signaling in rheumatoid synovial fibroblasts. BMC Res Notes 2017;10(1):403. doi: 10.1186/s13104-017-2715-5
20. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2008;58(4):1001-9. doi: 10.1002/art.23386
21. Su LC, Huang AF, Jia H, Liu Y, Xu WD. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis 2017;20(11):1631-7. doi: 10.1111/1756-185X.13202
22. Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. Curr Opin Pharmacol 2009;9(4):514-20. doi: 10.1016/j.coph.2009.05.003
23. Lu Li-Fan, Thai To-Ha, Pedro Calado D, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. Immunity 2009;30(1):80-91. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.010
24. Huffaker TB, O'Connell RM. MiR-155-SOCS1 as a functional axis: Satisfying the burden of proof. Immunity 2015;43(1):3-4. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.020
25. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nat Rev Immunol 2010;10(2):111-22. doi: 10.1038/nri2708
26. Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Ekbom A, Backlin C, Granath F, et al. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006;54(3):692-701. doi: 10.1002/art.21675
27. Nagpal SDS, Singh NP, Mishra P, Singh A. Lymphoma in rheumatoid arthritis - Catastrophic sequela of a common disease. JAPI. 2018;66(7):87-9.