مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

بیان miR-148a در تومورهای منتژیومای انسانی

مهدیه مودی[۱]، دکتر مجید خیراللهی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تومورهای منتژیوما از شایع‌ترین تومورهای مغزی هستند که از لایه‌ی منتژ منشأ می‌گیرند. اگرچه درصد زیادی از انواع منتژیوما خوش خیم هستند و شمار معدودی از تغییرات ژنتیک دارند، با این حال موقعیت داخل جمجمه‌ای آن‌ها اغلب منجر به پیامدهای جدی و مرگ‌بار می‌شود. به دنبال کشف نقش پروتئین Phosphatase and tensin homolog (PTEN)، به عنوان یک مهارکننده‌ی تومور در منتژیوما که یکی از اهداف miR-148a می‌باشد و از آن جایی که این میکروRNA در بررسی نمونه‌های تومور مغزی با تکنیک Microarray افزایش بیان نشان داده بود، در این مطالعه به ارزیابی الگوی بیان این میکروRNA در منتژیوما پرداختیم.

روش‌ها: ما الگوی بیان miR-148a را بین ۲۵ نمونه‌ی بافتی منتژیوما و چهار نمونه‌ی طبیعی با استفاده از تکنیک Real-time polymerase chain reaction بررسی کردیم.

یافته‌ها: سطح بیان miR-148a بین نمونه‌های بافتی منتژیوما و نمونه‌ی طبیعی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: از آن جایی که تفاوت معنی‌داری در بیان miR-148a با بافت طبیعی وجود دارد، با انجام بررسی‌های بیشتر شاید بتوان miR-148a را به عنوان یک نشانگر در تومورهای منتژیوما مطرح نمود.

واژگان کلیدی: منتژیوما، بیان miR-148a، Real-time polymerase chain reaction

ارجاع: مودی مهدیه، خیراللهی مجید. **بیان miR-148a در تومورهای منتژیومای انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۵۲-۲۵۷

مقدمه

منتژیوما یک مجموعه‌ی متنوع از تومورهای مغزی ناشی از منتژ می‌باشد؛ منتژ نیز، خود جزء لایه‌های احاطه کننده‌ی سیستم اعصاب مرکزی است. تومورهای خوش‌خیم منتژیومای تشخیص داده شده مسؤول حدود ۳۳/۸ درصد از همه‌ی تومورهای مغزی در طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۶ در ایالت متحده‌ی امریکا بوده است. منتژیوما بر اساس سیستم طبقه‌بندی WHO (World Health Organization) به سه کلاس تقسیم‌بندی می‌شود (۱).

اگر چه نزدیک به ۹۰ درصد موارد منتژیوما خوش‌خیم و همراه با نقایص ژنتیکی محدود است، اما موقعیت داخل جمجمه‌ای آن اغلب منجر به نتایج جدی و مرگ‌بار می‌شود. همچنین، میزان بقا در این

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیراللهی

Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

بیماران کمتر از افراد طبیعی است. به عنوان مثال در فنلاند، آنالیز میزان بقا از یک گروه ۱۹۸۶ نفری در بین سال‌های ۱۹۵۳ تا ۱۹۸۴ نشان داد که متوسط ۱۰ سال بقا در بیماران، نسبت به شاهد سالم، ۸۶ درصد است (۲).

در مواردی که تومور بدون مشکل باشد، معاینه و انجام MRI (Magnetic resonance imaging) و سی‌تی اسکن توصیه می‌شود و در موارد علامت‌دار، جراحی انجام می‌گردد. گاهی نمونه‌برداری و جراحی، به دلیل موقعیت حساس تومور، امکان‌پذیر نیست و تنها، رادیوتراپی قابل انجام می‌باشد. به همین دلیل، استفاده از درمان‌های غیرتهاجمی، امروزه به عنوان یک روش جدید مطرح است. تماس با پرتوها، جنسیت و جهش‌های ژنتیک از جمله فاکتورهای مؤثر در منتژیوما هستند. استعداد ارثی به منتژیوما، هم به وسیله‌ی تاریخچه‌ی خانوادگی، و هم به واسطه‌ی ژن‌های کاندید در مسیر ترمیم DNA تأیید شده است (۱).

علاوه بر این ژن‌ها، دسته‌ی دیگری از ژن‌ها به نام میکروRNAها نیز در تومورزایی این نوع از سرطان‌ها نقش دارد (۳). میکروRNAها، مولکول‌های کوچک غیر کدکننده‌ی RNA هستند که بیان ژن‌ها را از طریق اتصال به ناحیه‌ی 3'UTR از mRNA تنظیم می‌کنند (۵-۴). حدود ۳ درصد از ژن‌های انسانی، میکروRNAها کد می‌کند و بیش از ۳۰ درصد پروتئین انسانی به وسیله‌ی میکروRNAها تنظیم می‌شود. میکروRNAها، نقش کلیدی در فرایندهای بیولوژیک شامل تکثیر، تمایز و آپوپتوز دارد. یک میکروRNA ممکن است ژن‌های هدف غیروابسته‌ی گوناگونی را تنظیم کند و به موجب آن، فعالیتهایی نظیر تکثیر سلولی یا آپوپتوز را کنترل نماید. بدین ترتیب، احتمال می‌رود میکروRNAها در بیماری‌های انسانی نظیر سرطان‌ها نقش داشته باشد (۶).

نقش میکروRNAها در سرطان‌ها از مدت‌ها پیش تأیید شده است. به عنوان مثال، در یک مطالعه نشان داده شد که الگوی بیان ۱۴ میکروRNA در منتژیوما نسبت به بافت طبیعی به طور معنی‌داری تغییر می‌کند (۴).

بعد از اثبات نقش میکروRNAها در سرطان، محققان به دنبال شناسایی سایر میکروRNAها بودند تا شاید بتوان، به عنوان پتانسیل تشخیصی- درمانی از آن‌ها استفاده کرد. هم‌اکنون، میکروRNAهای زیادی به عنوان انکوژن و یا ژن سرکوبگر تومور شناخته شده و بعضی از آن‌ها به عنوان بیومارکر سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۷).

miR-148a بر روی بیان PTEN (Phosphatase and tensin homolog)، یک مهار کننده‌ی تومور که به خوبی مطالعه شده است، تأثیر دارد (۸) و مطالعات نشان داده است که PTEN در منتژیوما درگیر است (۹). این میکروRNA در تومورهای مغزی نیز دارای نقش می‌باشد (۱۴-۱۰). به عنوان مثال، در بررسی نقش بیان miR-148a در میزان بقای بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما، طی آنالیز آماری داده‌های ۲۲۰ بیمار مبتلا مشخص شد که miR-148a در آن نمونه‌ها نسبت به بافت سالم مغز افزایش بیان داشت و نیز بیان افزایش یافته‌ی این میکروRNA بر بقای بیماران مؤثر بود (۱۵). علاوه بر این، مشخص شد که این یافته‌ها می‌تواند برای درک بهتر مکانیسم گلیوماژنز و تشخیص زودرس بیماران با خطر بالا به کار رود.

همچنین، miR-148a از جمله‌ی میکروRNAهایی است که به عنوان بیومارکر شناخته می‌شوند. به عنوان

مثال، Chen و همکاران الگوی بیان دو میکروRNA شامل 148a و 152 را در ۱۰۱ نمونه‌ی توموری معده و روده (Gastrointestinal) با روش Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) بررسی کردند و یافته‌های آن‌ها نشان داد که میزان بیان miR-148a به طور معنی‌داری نسبت به بافت طبیعی مجاور خود کاهش می‌یابد (۱۶). همچنین، آن‌ها نشان دادند که این میکروRNA در کارسینوژنز تومورهای معده و روده نقش دارد و کاهش بیان آن می‌تواند به عنوان بیومارکر به کار رود.

بنابراین، با توجه به بیان این میکروRNA در تومورهای مغزی گلیوما (۱۸-۱۷، ۱۳) و نقش احتمالی آن در منتژیوما، در این مطالعه برای اولین بار، تصمیم به بررسی بیان این میکروRNA با تکنیک RT-PCR در ۲۵ تومور مغزی منتژیوما و ۴ نمونه‌ی طبیعی گرفته شد.

روش‌ها

نمونه‌ها و بیماران: بعد از دریافت رضایت‌نامه‌ی کتبی و رعایت ملاحظات اخلاقی، نمونه‌ها در طول عمل جراحی از ۲۵ نمونه‌ی منتژیوما در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌های طبیعی، از ۴ فرد بدون هیچ شواهدی از سرطان از پزشکی قانونی اصفهان به دست آمد. قابل ذکر است که نمونه‌های طبیعی از افرادی که دو ساعت قبل مرده بودند، گرفته شد. در آخر، نمونه‌ها از نظر پاتولوژی به عنوان منتژیوما تشخیص داده شد.

جداسازی RNA از نمونه‌ها و سنتز cDNA: نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰ °C تا زمان آنالیز ذخیره شد. RNA از نمونه‌های ۱۰ میلی‌گرمی با تکنیک‌های استاندارد استخراج شد. کل RNA با محلول TRIzol (Invitrogen) مطابق پروتکل استخراج، برای نمونه‌های جامد استخراج و در آب بدون RNase، مطابق دستور سازنده‌ی پروتکل حل شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روش‌های UV (Ultraviolet) اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد.

پس از استخراج، ۲ میکرولیتر RNA کل با استفاده از miRCURY LNA™ microRNA PCR (cDNA synthesis kit) به cDNA تبدیل شد.

RT-PCR: به دنبال سنتز cDNA، RT-PCR با کیت ExiLENT SYBR® Green master mix انجام پذیرفت. از پرایمر u6 برای نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. برای هر واکنش نیز سه بار تکرار گذاشته شد.

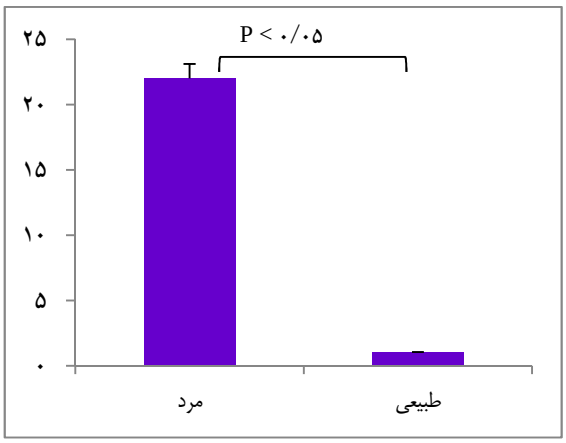
آنالیز آماری: پس از اتمام واکنش، با استفاده از نرم‌افزار دستگاه RT-PCR، بیان میکروRNAها به صورت کمی استحصال شد و آنالیزهای آماری توسط متخصص آمار به منظور مقایسه‌ی میانگین بیان نسبی miR-148a در دو گروه توموری منتژیوما و طبیعی و نیز در درجه‌های مختلف از این تومور، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۵ نمونه‌ی تومور مورد بررسی قرار گرفت که ۷ مورد متعلق به مردان و ۱۸ مورد متعلق به زنان بود. مینگین سن افراد ۰/۵۷ ۵۴/۰۰ با بازه‌ی ۸۱-۱۶ سال به دست آمد.

همچنین از نظر Staging، ۱۹ بیمار در درجه‌ی ۱، ۴ بیمار در درجه‌ی ۲ و ۲ بیمار در درجه‌ی ۳ بیماری بودند.

در بررسی بیان miR-148a در نمونه‌های مننژیوما، نتایج مقاسه‌ی بیان این میکروRNA در ۲۵ نمونه‌ی مننژیوما نسبت به ۴ نمونه‌ی سالم حاکی از افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در نمونه‌های مننژیوما نسبت به نمونه‌های طبیعی بود (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه‌ی الگوی بیان miR-148a در نمونه‌های مننژیوما نسبت به نمونه‌های طبیعی

بحث

بعد از اثبات نقش میکروRNAها در سرطان، محققان به دنبال شناسایی سایر میکروRNAها بودند تا شاید بتوان به عنوان پتانسیل تشخیصی- درمانی از آن‌ها استفاده کرد. هم‌اکنون، میکروRNAهای زیادی به عنوان انکوژن و یا ژن سرکوبگر تومور و یا حتی بیومارکر سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۷). به عنوان مثال، miR-148a از جمله میکروRNAهایی است که در سرطان معده به عنوان بیومارکر شناخته شده است (۱۶).

به تازگی، پروتئین PTEN به عنوان مهار کننده شناخته شده است. جهش‌های سوماتیک در این ژن در طیف وسیعی از سرطان‌ها، نظیر گلیوبلاستوما، یافت شده است. همچنین، جهش‌های رده‌ی زایای این ژن در بیماران Cowden، که مستعد به مننژیوما هستند، نیز دیده شده است. بنابراین، این ژن به عنوان پروتئین دارای نقش احتمالی در مننژیوما مطرح است (۱۹).

این ژن دارای جایگاه‌های اتصال برای مجموعه‌ای از میکروRNAها شامل miR-148a می‌باشد. نشان داده شده است که miR-148a در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما نسبت به افراد سالم افزایش بیان دارد و نیز، بیان افزایش یافته‌ی این میکروRNA بر بقای بیماران مؤثر است. ضمن این که این یافته‌ها را می‌توان برای درک بهتر مکانیسم گلیوماژنز و تشخیص زودرس بیماران با ریسک بالا به کار برد (۱۵).

Huse و همکاران نقش میکروRNAها را در تنظیم بیان انکوژن‌ها در سه نمونه‌ی بافتی گلیوبلاستوما با روش Microarray بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این میکروRNA افزایش بیان ۱۲/۳ برابری نسبت به نمونه‌ی طبیعی داشت. همچنین، آن‌ها نشان دادند که ژن PTEN، که یک مهار کننده‌ی تومور است، می‌تواند یکی از اهداف مهم این میکروRNA باشد (۱۷).

از آن جایی که بیان miR-148a در نمونه‌های مغزی گلیوما با تکنیک Microarray افزایش بیان نشان داده بود و با توجه به نقش PTEN در مننژیوما و این که این پروتئین از اهداف miR-148a می‌باشد، ما بیان این میکروRNA را در ۲۵ نمونه‌ی خوش‌خیم مننژیوما بررسی کردیم. نتایج آنالیز ما نشان داد که بیان miR-148a هم‌خوان با داده‌های Microarray افزایش معنی‌داری در نمونه‌های بافتی مننژیوما نسبت

به نمونه‌ی طبیعی داشت.

به عنوان نتیجه، از آن جایی که تفاوت معنی‌دار در بیان miR-148a با بافت طبیعی وجود دارد، با انجام بررسی‌های بیشتر شاید بتوان miR-148a را به عنوان یک نشان‌گر در تومورهای مننژیوما مطرح نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مهدیه مودی به شماره‌ی پایان نامه‌ی ۳۹۲۴۶۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

References

1. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. J Neurooncol 2010; 99(3): 307-14.
2. Raizer J. Meningiomas. Curr Treat Options Neurol 2010; 12(4): 360-8.
3. Zhi F, Zhou G, Wang S, Shi Y, Peng Y, Shao N, et al. A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. Int J Cancer 2013; 132(1): 128-36.
4. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009; 136(2): 215-33.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2): 281-97.
6. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol 2007; 23: 175-205.
7. Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogrodowski P, et al. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. Genes Dev 2009; 23(24): 2806-11.
8. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IOL, Feitelson MA. Abstract C16: miR-148a regulates the expression of PTEN in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. Cancer Research 2011; 71(18 Suppl): C16.
9. Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, et al. Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. Neuropathol Appl Neurobiol 1998; 24(1): 3-8.
10. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2010; 28(10): 1721-6.
11. Brenner WG, Romanov GA, Kollmer I, Burkle L, Schmulling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. Plant J 2005; 44(2): 314-33.
12. Becanovic K, Pouladi MA, Lim RS, Kuhn A, Pavlidis P, Luthi-Carter R, et al. Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. Hum Mol Genet 2010; 19(8): 1438-52.
13. Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, et al. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. J Neurochem 2011; 118(3): 449-57.
14. Liu TP, Zeng Y. Large time behavior of solutions for general quasilinear hyperbolic-parabolic systems of conservation laws (Memoirs of the American Mathematical Society). Providence, RI: American Mathematical Society; 1997.
15. Srinivasan S, Patric IR, Somasundaram K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. PLoS One 2011; 6(3): e17438.
16. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. J Gastrointest Surg 2010; 14(7): 1170-9.
17. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. Genes Dev 2009; 23(11): 1327-37.
18. Rao SA, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. Mod Pathol 2010; 23(10): 1404-17.
19. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, Simon M, Schramm J, Wiestler OD, et al. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. Int J Cancer 2001; 94(2): 218-21.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 06.12.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 16.03.2015

Expression of miR-148a in Human Meningioma Tumors

Mahdiyeh Moodi MSc[1], Majid Kheirollahi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Meningioma is one of the most prevalent brain tumors and is derived from meninges. Although, the tumor is usually benign and has limited numbers of genetic aberrations, but intracranial location often cause serious and lethal outcomes. Following role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein, a tumor suppressor gene that is one of miR-148a targets in meningioma and as the microRNA has showed up regulation in brain tumor samples in microarray data, we assessed miR-148a expression pattern in meningioma.

Methods: We evaluated miR-148a expression among 25 meningioma and 4 normal tissues using real-time polymerase chain reaction method.

Findings: The expression level of miR-148a showed significant difference between meningioma and normal tissues ($P < 0.05$).

Conclusion: As a result, since there is a significance difference in the miR-148a expression in meningioma tumors compared to normal tissues, the microRNA might be considered as a marker in meningiomas tumors, with further investigations.

Keywords: Meningioma, miR-148a expression, Real-time polymerase chain reaction

Citation: Moodi M, Kheirollahi M. **Expression of miR-148a in Human Meningioma Tumors.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 252-7

1- Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Majid Kheirollahi, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir