Journal of Military Medicine
2018, Volume 20, Issue 1
Pages: 116-126

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

Evaluating the Epigenetic Effects of the miR17/92 Cluster in Noninvasive Screening of Genetically-Based Respiratory Diseases

Ghorbani Alvanegh Akbar, Tavallaei Mahmood, Edalat Houri*

Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 25 October 2017 **Accepted**: 3 March 2018

Abstract

Background and Aim: Both Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and mustard lung victims of chemical injury (unlike asthma and allergy) are known respiratory diseases with a substantial genetic background and there are no highly effective medications for either disease. Considering the many similarities between the two diseases, both can be considered simultaneously under one category. Therefore, we assessed the expression of miR-20a and miR-92a as representatives of the miR-17/92 cluster due to the effective interference of these two miRNAs in the signaling pathways of inflammation and hypoxia in the pulmonary serum (consisting of Mustard Lung and COPD, simultaneously).

Methods: Stem-Loop Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction was used to examine the expression of miR-20a and miR-92a simultaneously in patients with COPD (n=25) and mustard lung (n=50).

Results: The results showed that the expression of both miR-20a and miR-92a was significantly downregulated in patients with COPD and chemical injuries when compared to the control group. The expression of each of two miRNAs in the moderate and severe phases of the disease was more downregulated in the mild stage, and miR-92a showed a further downregulation compared to miR-20a ($p<0.05$).

Conclusion: The downregulation of miR-20a and miR-92a might be due to alterations in 1- genomic and/or 2- environmental and/or 3- ecogenomic (affected by epigenomic) factors which requires intensive research in this field. Our results may shed light on new effective strategies for the treatment of respiratory diseases by regulating the mir17/92 cluster by regulating related factors. The members of the oncogenic miR17/92 cluster are significantly upregulated in lung cancer and have the potential to be used as biomarkers in the non-invasive screening of respiratory diseases. Furthermore, these miRNAs can be used for distinguishing respiratory diseases from lung cancer and cardiovascular diseases (also known as COPD comorbities).

Keywords: Mustard Lung, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), miR17/92 cluster, miR-20a, miR-92a

*Corresponding author: **Houri Edalat**, Email: h597782@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷
صفحات: ۱۲۶-۱۱۶

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

بررسی تاثیر اپی ژنتیکی کلاستر miR17/92 در غربالگری غیرتهاجمی بیماریهای تنفسی با زمینه ژنتیکی

اکبر قربانی الوانق، محمود تولایی، حوری عدالت *

مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بیماران مبتلا به انسداد ریوی مزمن [Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)] و جانبازان شیمیایی مبتلا به ریه خردلی (Mustard Lung)، هردو جزء بیماریهای ریوی با زمینه قدرتمند ژنتیکی می باشند که هنوز درمان قطعی برای هیچیک وجود ندارد. با توجه به اشتراکات فراوان بین دو بیماری می توان هردو را به طور همزمان تحت یک گروه بررسی نمود. بدین جهت، ما بیان دو miRNA با عنوان miR-20a و miR-92a را به عنوان نمایندگان کلاستر miR-17/92 به دلیل دخالت موثر این دو miRNA در مسیرهای سیگنالینگ التهاب و هیپوکسی در سرم بیماران ریوی [متشکل از Mustard Lung و COPD (به طور همزمان)] بررسی کردیم.

روش‌ها: Reaction برای بررسی بیان miRNAهای miR-20a و miR-92a به طور همزمان در بیماران مبتلا به COPD و Mustard Lung (۵۶ تعداد بیمار) استفاده گردید.

یافته ها: نتایج نشان دادند بیان هر دوی miR-20a و miR-92a بصورت قابل توجهی در سرم بیماران COPD و مصدومین شیمیایی نسبت به افراد نرمال کاهش می یابد. همچنین، بیان هریک از دو miRNA مورد بررسی در مراحل متوسط و شدید بیماری نسبت مرحله خفیف کاهش بیشتری داشته و miR-92a نیز کاهش بیشتری را نسبت به miR-20a نشان می داد.

نتیجه‌گیری: این تغییرات می تواند در نتیجه تغییرات ۱- ژنومیک و/یا ۲- محیط و/یا ۳- اکوژنومیک (متاثر از اپی ژنومیک) باشد که تعیین دقیق آن نیازمند تحقیقات گسترده تری در این حوزه است. با استفاده از نتایج این تحقیق می توان روشهای جدیدی را در استراتژیهای درمانی بیماران تنفسی با هدف قرار دادن کلاستر مورد بررسی از طریق هریک از سه جنبه فوق الذکر به کار گرفت. اعضای کلاستر انکوژن miR17/92 (با افزایش بیان در سرطان ریه) قابلیت کاربرد بیومارکری در غربالگری غیرتهاجمی بیماریهای تنفسی را دارا هستند. به علاوه، این miRNAها می توانند به خوبی به عنوان فاکتور افتراقی یا تمایز دهنده با سرطان ریه و بیماریهای قلبی-عروقی که اغلب به عنوان بیماری‌های همزمان با هردوی این بیماریها (Mustar Lung و COPD) مطرح می باشند نیز به کار روند.

کلیدواژه‌ها: ریه خردلی، بیماری انسداد مزمن ریوی، miR17/92 cluster، miR-20a، miR-92a

*نویسنده مسئول: **حوری عدالت**. پست الکترونیک: h597782@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

مقدمه

امروزه با شیوع روزافزون بیماریهای تنفسی در دنیا مواجه هستیم. بیماریهای تنفسی امروزه تنها در انگلیس بالغ بر ۱۱ میلیارد یورو هزینه در سال را به خود اختصاص می دهند (۱). بیماریهای تنفسی شایعی چون آسم و بیماری انسداد مزمن ریوی (COPD) تا ۱۵ درصد افراد بالغ را در ایالات متحده درگیر می کند که به دنبال خود هزینه های گزاف جانی و اقتصادی را در پی خواهد داشت. بیماریهای دیگری همچون فیبروز ریوی با نرخ پایین تر و بیماریهایی نظیر عفونتهای تنفسی که با نرخ بالاتری اتفاق می افتند نیز در زمره بیماریهای تنفسی جای می گیرند. از این رو، یافتن استراتژیهای نوین درمان و پیشگیری از این بیماریها به افزایش کیفیت زندگی و صرفه جوییهای کلان اقتصادی خواهد انجامید (۲).

امروزه اهمیت ژنتیک در کلینیک به عنوان یک تست مکمل چه در تشخیص، چه در پیش آگهی و چه در فارماکوژنتیک یا طب فردی غیر قابل انکار است. نقش ژنتیک در درمان و طراحی داروها نیز بر کسی پوشیده نیست (۳).

ژنها و محیط هردو از عوامل ایجاد بسیاری بیماریهای غیر مندلی هستند. ریه ارگانی است که دائما در معرض محیط قرار داشته و مدت مدیدی است که نقش گرد و غبار، آزبست و سیگار به ترتیب در ایجاد آسم، سرطان ریه و COPD مشخص گردیده است. ژنها که عوامل مستعد کننده میزبانی را تشکیل می دهند در ایجاد تفاوت در ایجاد یا شدت بیماری بین افراد در معرض عوامل محیطی یکسان نقش دارند (۲). میزان اهمیت هریک از دو عامل ژنها و محیط و اندرکنش میان این دو نقش مهمی را در بیماریهای تنفسی بازی می کند. این اندرکنشها که تحت عنوان ژنومیک محیطی (اکوژنومیک) نامیده می شوند، علت بی چون و چرای ایجاد بیماریهای (پاتوژنز) بیماریهای تنفسی هستند. در بیماریهای تنفسی، از یک سو بیماریهایی نظیر سیستیک فیبروزیس (CF) قرار دارد که زمینه ژنتیکی در آن نقش اصلی و اساسی صد در صدی را ایفا می کند و از سویی دیگر، بیماریی همچون آسم قرار گرفته که در آن زمینه ژنتیکی نقش ناچیزی داشته و فاکتورهای محیطی در ایجاد آن دخالت شایانی دارند. از این رو، تکلیف بیماریهای تک ژنی مانند سیستیک فیبروزیس مدتهاست که روشن شده و آزمایشات بالینی مربوط به ژن درمانی آن فازهای نهایی خود را طی کرده است درست در نقطه مقابل بیماریهایی مانند آسم و آلرژی هستند که محیط در آنها نقش عمده ای را بازی می کند. رژیم غذایی، آلرژنهای محیطی، آلودگیهای خانگی و هوای آزاد، ویروسها و برخی عفونتها در ایجاد این بیماری نقش به سزایی را ایفا می کنند. به علاوه عوامل دموگرافیکی همچون سن، جنس، نژاد و وضعیت اقتصادی اجتماعی کشور محل زندگی از دیگر فاکتورهای دخیل در ایجاد بیماری آسم هستند (۶-۴). از این رو، ژنهای درگیر در آسم و آلرژی مشخص شده ولی به دلیل نقش کوچک هریک از این ژنها در پاتوژنز نهایی این بیماری پیشرفت چشمگیری در این حوزه مشابه با بیماری CF حاصل نگردیده است. به گونه ای که هنوز نمی توان تصمیم درستی بر مبنای نقش زمینه ژنتیکی فرد و تاثیر آن در بروز یا حتی شدت بیماری ارائه نمود و این مسئله بسیار پیچیده ای است. همین کاستیها موجب باز شدن راه مطالعات اپی ژنتیکی (که همان مطالعات مربوط به تاثیر محیط بر بروز یا شدت بیماری هستند) به حوزه بیماریهای تنفسی گشته است (۷, ۸). به گونه ای که طی یک بررسی eGWAS یا همان GWAS اپی ژنومی، نهایتا ۳۴ ژن تعیین گردید که در نتیجه تغییرات اپی ژنتیکی با کاهش متیلاسیون و افزایش IgE در آسم ارتباط دارند. (۹). بنابراین، به طور خلاصه می توان گفت به یمن درک دانشمندان از نقش اپی ژنتیک علاوه بر نقش مستقیم محیط در پاتوژنز آسم، درمان این بیماری در حال گذار از حالت تسکین (با جلوگیری از مواجهه با محرکهای محیطی) به حالت پیشگیری (از طریق دخالت در مکانیزم های اپی ژنتیکی) است (۲).

اپی ژنتیک (از جمله miRNA) که مشتمل بر عواملی غیر از توالی DNA تاثیر گذار بر بیان ژنهاست به خوبی قادر است اکوژنومیک را تفسیر کند. به طوری که هرچند فاکتورهای اپی ژنتیکی عواملی قابل وراثت هستد اما بر خلاف توالی DNA براحتی تحت تاثیر محیط قرار گرفته و بیان ژنها را نیز متعاقبا تحت تاثیر قرار می دهند (۱۰).

در مقایسه با آسم، وضعیت در COPD (سندرمی تشکیل یافته از برونشیت مزمن و آمفیزم) تا حدودی متفاوت است. COPD بیماری با خصوصیت میانه است که علاوه بر نقش محیط (سیگار)، ژنتیک نیز می تواند تا ۵۰٪ در آن نقش بازی کند (۱۱). در ظاهر و در نگاه اولیه، دود سیگار در ایجاد بیماری نقش عمده عوامل محیطی را به ذهن متبادر می کند، اما با کمی تامل در سیر پیشرفت نتایج حاصله در منابع انتشار یافته برتری عامل ژنتیکی در این بیماری مشخص می گردد. این غلبه فاکتورهای ژنتیکی در COPD به بیماران کمک می کند تا دریابند واقعا آنها در بیماریشان مقصر نیستند (۱۲). بدین معنی که این سیگار کشیدن ارادی آنها نیست که موجب بیماریشان گشته است، بلکه ژنهای به ارث رسیده به آنها دچار نقص می باشند. این نقص می تواند هم در ژنهای استعداد ابتلا به اعتیاد و هم در ژنهای استعداد به COPD وجود داشته باشد. بیش از ۷۵٪ این بیماران به دلیل مشکلاتی که روش اسپیرومتری دارد، تا سالهای انتهایی عمرشان تشخیص داده نمی شوند و شاید این یکی از علتهای مرگ و میر بسیار بالای این بیماران به عنوان سومین عامل کشنده جهانی تا سال ۲۰۲۰ به حساب بیاید و اینجاست که اهمیت فوق العاده تستهای ژنتیکی در این بیماری مشخص می گردد (۱۳). چرا که ژنهای مستعد کننده به اعتیاد به دود سیگار همچون CYP2A6 در افراد COPD نقش مهمی را بازی می کنند (۱۴). با توجه شباهت فوق العاده بیماریهای تنفسی COPD و Mustard Lung این مسئله اخیر در مورد

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

بیماری Mustard Lung نیز صدق می کند. حداقل دو بررسی GWAS گسترده با همکاری جهانی ژنهای مرتبط با این بیماری را به طور مستقل گزارش نموده اند (۱۵, ۱۶). هرچند در ابتدا هنوز نمی دانستند که آیا SNP های کشف شده در استعداد به اعتیاد دخالت دارند یا در استعداد به COPD نقش بازی می کنند (۱۷)؟ برخی بررسیها به طور اختصاصی به منظور تعیین ارتباط قطعی برخی ژنهای کشف شده توسط GWAS آزمایشاتی را انجام داده اند (۱۸, ۱۹). امروزه تقریبا ژنی در COPD باقی نمانده که ناشناخته مانده باشد (۲۰). به طوری که اهداف درمانی (همچون آنتاگونیست گیرنده نیکوتین) و بیومارکرهای جدید نیز برای این بیماری پیشنهاد شده است (۱۱). اما متاسفانه در مورد بیماری Mustard Lung هنوز تحقیقات گسترده high-throughput همچون GWAS برای تعیین کلیه عوامل ژنتیکی دخیل در ایجاد این بیماری صورت نگرفته و هنوز جای بسیار زیادی برای انجام تحقیقات ژنتیکی باقی گذاشته است.

بررسی‌های قبلی ما نشان داد که دو miRNA تحت عنوان miR-20a و miR-92a (از جمله اعضای مهم کلاستر انکوژن miR17/92) در سرم جانبازان شیمیایی کاهش معنی داری را نشان می دهد (۲۱). از این رو، بر آن شدیم تا تاثیر اپی ژنتیکی این کلاستر را در غربالگری غیر تهاجمی بیماریهای تنفسی با زمینه ژنتیکی (یعنی Lung Mustard و COPD به طور همزمان) بررسی کنیم. این مسئله از آنجا حائز اهمیت است که در بیماریهای شایعی همچون آسم و آلرژی تاثیر محیط و اپی ژنتیک و به ویژه نقش miRNAها به عنوان کاندیدهای ایده آل در غربالگری غیرتهاجمی این بیماران بلامنازع است. لکن جستجوی تعیین میزان نقش فاکتورهای اخیر در بیماریهای تنفسی با زمینه ژنتیکی قویتر همچون Mustard Lung یا COPD ضروری به نظر می رسد. از آنجایی که عوارض پاتوفیزیولوژیکی هر دو بیماری شباهت دارند، در این بررسی، نقش اپی ژنتیکی کلاستر miR17/92، برای تعیین قابلیت کاربرد بیومارکری این کلاستر به صورت یک فاکتور غربالگری غیر تهاجمی، به طور همزمان در هردو بیماری Mustard Lung و COPD مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

بیماران و نمونه گیری: در این مطالعه مورد–شاهد، ۵۶ بیمار COPD و جانباز شیمیایی به طور همزمان شرکت داده شدند. نمونه های بیماران از اسفند ماه ۱۳۹۲ تا خرداد ماه ۱۳۹۳ از کلینیک ریه بیمارستان بقیه الله جمع آوری شده بودند. ۱۹ فرد نرمال به منظور مقایسه میزان بیان نسبت به افراد بیمار در این بررسی شرکت داده شدند. مواجهه مصدومین شیمیایی با گاز خردل توسط کمیسیون عالی پزشکی تائید شد و تمامی بیماران COPD سابقه مصرف حداقل بیست پاکت در سال را داشتند و با استفاده از معاینات بالینی و تست های اسپیرومتری توسط پزشک فوق تخصص ریه بیماری آنها تایید شد و بیماران COPD که بیماری دیگری مثل دیابت، فشار خون و... داشتند در طرح شرکت داده نشدند. افراد نرمال هیچ بیماری نداشتند. از تمامی شرکت کنندگان رضایت نامه کتبی گرفته شد و برای هر فرد پرسشنامه پر شد. گروه بندی بیماران بدین صورت انجام شد: مصدومین شیمیایی بر اساس معاینات بالینی، تصاویر رادیولوژی از ریه و تستهای اسپیرومتری توسط پزشک فوق تخصص ریه و معتمد کمیسیون عالی پزشکی و بنیاد ایثارگران گروه بندی شدند. همچنین بیماران COPD بر اساس معاینات بالینی و نتایج تست اسپیرومتری گروه بندی شدند. بر این اساس کلیه بیماران تنفسی تحت این تحقیق به سه گروه خفیف، متوسط و شدید تقسیم شدند. به طور کلی ۲۰ نفر از بیماران تنفسی با زمینه ژنتیکی تحت بررسی در مرحله خفیف، ۱۶ نفر متوسط و ۲۰ نفر در مرحله شدید بیماری قرار داشتند.

میانگین FEV1 در بیماران تنفسی و گروه کنترل به ترتیب ۶۳/۱±۲۰/۴۷ و ۱۰۵±۳/۴ و میانگین FEV1/FVC در آنها به ترتیب ۶۹/۱±۱۲/۵ و ۸۲±۵/۴ بود.

استخراج RNA و تیمار با DNase I: از هر فرد مراجعه کننده ۵ سی سی خون سیاهرگی در لوله های ونوجکت ژل دار گرفته شد. نمونه های جمع آوری شده به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداری شد تا عمل انعقاد صورت گیرد سپس لوله ها ۲۰ دقیقه در ۲۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول رویی لوله ها که حاوی سرم است جداسازی و تا زمان استخراج RNA به فریزر ۸۰– درجه سانتیگراد منتقل شدند. جهت حذف پروتئینهای مهاری نمونه های سرم تحت تیمار با آنزیم پروتئیناز K (20 mg/ml, Thermo Scientific, Waltham, MA) قرار گرفتند. سپس ۲۵۰ میکرولیتر سرم با ۱ سی سی ریمازول (شرکت زیست ابزار پژوهان، تهران، ایران) مخلوط شد. پس از ورتکس و ۵ دقیقه استراحت کلروفرم اضافه گردید. پس از ۱۵ ثانیه تکان دادن به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ و فاز آبی بالایی محتوی RNA به تیوب جدید منتقل شده و مجددا پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل همانند بالا سانتریفوژ گردید. آنگاه به رسوب پس از اضافه کردن اتانول و خشک شدن آن، آب DEPC اضافه گردید. RNA با کمک دستگاه نانودراپ (MAESTRO GEN, Las Vegas, NV) از لحاظ کمی و کیفی بررسی شد.

به منظور حذف باقیمانده احتمالی DNA ژنومی در فرایند استخراج، تیمار با DNase I (Thermo Scientific) بدین نحو انجام پذیرفت. ۱ میکرولیتر از آنزیم با ۱ میکروگرم RNA در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C 37 انکوبه گردید.

سنتز cDNA و واکنش Stem-loop real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR): از روش Stem-loop RT که دقت و حساسیت بالایی دارد، استفاده شد. پس از طراحی پرایمرها (جدول–۱) و بلاست

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

آنها، ۲۵۰ نانوگرم RNA با ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر Stem-loop RT اختصاصی microRNA در حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای $70\ ^{o}C$ تیمار شد. ۱ میکرولیتر آنزیم RT (Thermo Scientific)، ۲ میکرولیتر Thermo dNTP (Scientific)، و ۴ میکرولیتر بافر RT 5X (Thermo Scientific) در حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر تهیه شده و روی یخ قرار داده شد. سنتز cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت ذیل انجام پذیرفت: ۱۵ دقیقه در $25\ ^{o}C$، ۱۵ دقیقه در $37\ ^{o}C$، ۶۰ دقیقه در $42\ ^{o}C$، و ۱۰ دقیقه در $70\ ^{o}C$ واکنش Real-time qRT-PCR در حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر مطابق پروتکل شرکت انجام پذیرفت (GeNet Bio, Daejeon, Korea). miR-16 به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. تکثیر با دستگاه ABI7900 (Applied Biosystems, Waltham, MA) انجام پذیرفت. واکنشها تماما به صورت دو تایی انجام شدند. و یک نمونه کنترل بدون RT به منظور تایید فقدان آلودگی DNA مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تایید انجام واکنش تکثیر نیز یک کنترل منفی فاقد cDNA نیز در واکنشها گنجانده شد و از نرم افزار LinReg PCR جهت تعیین کارایی پرایمرها استفاده گردید.

جدول-۱. اسامی و توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

hsa-miR-92a-1	(RT)hsa-miR-92a-1	GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACACAGGC
	miR-92a-1-F	TGTATTGCACTTGTCCCG
	miRNA 92a-1	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-20a	(RT)hsa-miR-20a	GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACCTACCTGCACTA
	miR-20a-F	GGCCGCGCTAAAGTGCTT
	miR-20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-16	(RT)Hsa-miR-16	GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGCATACGACCGCCAATATTTA
	miR-16-F	GGGTCAGGTAGCAGCACG
	miR-16	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
universal R		AGAGCAGGGTCCGAGGTATTC

روش تجزیه تحلیل داده ها: نرم افزار آماری Statistical Program for Social Sciences (SPSS) ویرایش ۱۶ برای تجزیه و تحلیل اطلاعات مثل سن بیماران، اسپیرومتری و داده های Real time PCR و همچنین نرم افزار Relative expression software tool (REST 2009 V2.0.13) برای تجزیه وتحلیل داده های Real time PCR استفاده شد. برای بررسی توزیع نرمال داده ها از تست 1-sample Kolmogorov-Smirnov (KS) استفاده شد. تجزیه و تحلیل نمودار Receiver Operating Characteristic (ROC) برای بررسی حساسیت و اختصاصیت microRNA ها انتخاب شده جهت تفکیک بین مصدومین شیمیایی، بیماران COPD و افراد نرمال استفاده شد.

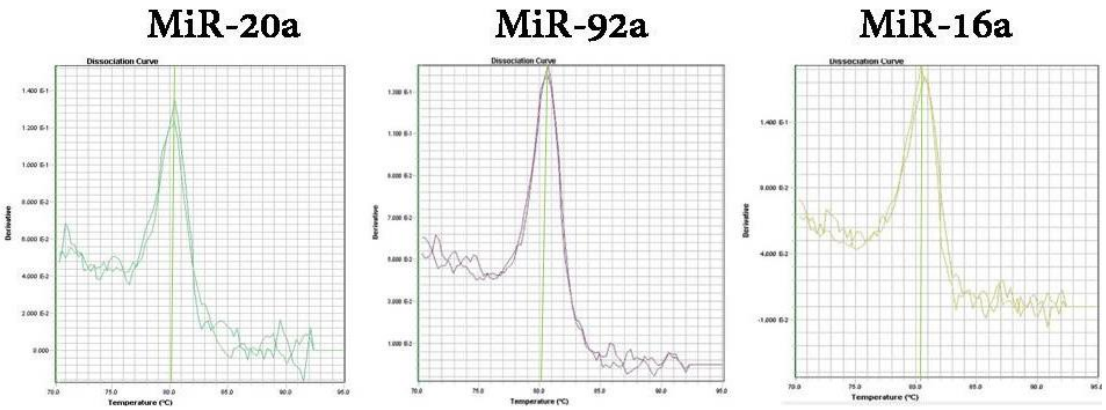
ملاحظات اخلاقی: این پژوهش با رعایت صداقت و امانت و اراده کامل افراد بیمار به منظور شرکت در این مطالعه انجام گرفته است. همچنین سنتهای دینی و اجتماعی نیز در طی مراحل جمع آوری نمونه مورد نظر قرار گرفته و امانتداری و محرمانه بودن اطلاعات کاملا مد نظر بوده است. به علاوه، استفاده از غیر تهاجمی ترین روشها (خونگیری) برای رساندن کمترین آسیب به افراد، نیز مد نظر قرار گرفته است.

نتایج

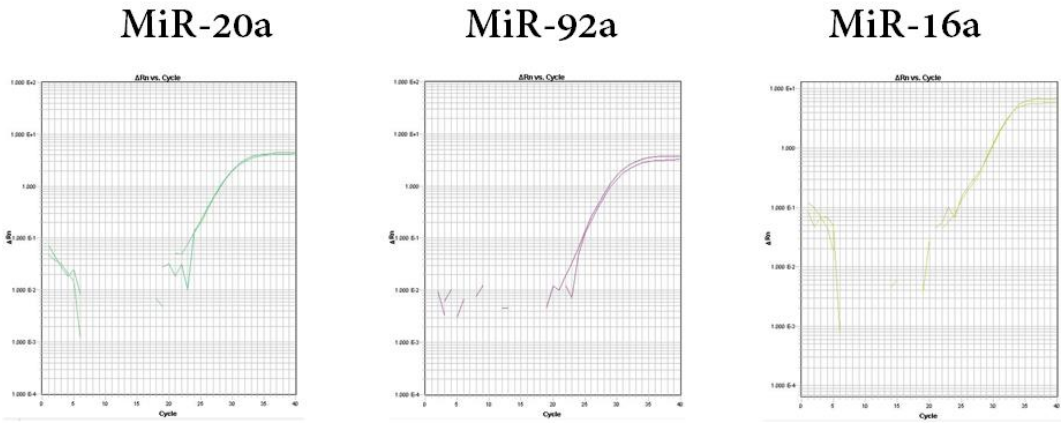
بیماران: تحقیق حاضر ۵۶ بیمار و ۱۹ نمونه کنترل را مورد بررسی قرار داد. بر اساس FEV1، ۲۰ نفر از بیماران تنفسی تحت بررسی در مرحله خفیف، ۱۶ نفر متوسط و ۲۰ نفر در مرحله شدید بیماری قرار داشتند. همه بیماران مذکر و ۲۵ بیمار در رده سنی ۴۰ تا ۵۰ سال و ۳۱ نفر در رده سنی ۵۰ تا ۶۰ سال قرار داشتند.

بهینه سازی Real-Time PCR و بیان افتراقی miR-20a و miR-92a در بیماران و نمونه های کنترل: تمامی نمونه ها بجز نمونه های NTC (تمام اجزاء واکنش بجز cDNA) تکثیر شده بودند و نمودارهای تکثیر و منحنی تمام نمونه ها بصورت دوبار تکرار بطور دقیق روی هم افتاده بودند که نشان دهنده دقت کار است (اشکال ۱ و ۲). نتایج در هر بار انجام Real time PCR از هر سه نمونه MiR-20a، miR-92a و miR-16 به همراه نمونه های NTC آنها با ژل آگارز چک شد (شکل-۳).

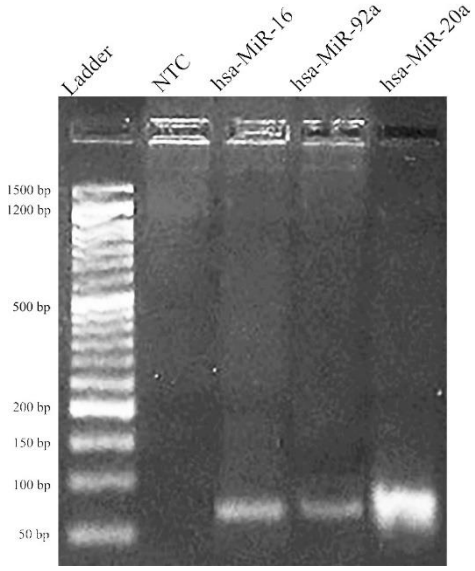
Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018



شکل-۱. منحنی ذوب miR-20a، miR-92a و miR-16: منحنی ذوب در هر سه miR-20a، miR-92a و miR-16 بطور دقیق روی هم افتاده و خط عمدی وسطی نشان دهنده دمای ذوب محصول هر یک را نشان می دهد چون محصول هر سه MicroRNA تقریبا تعداد نوکلئوتید یکسان و در حدود ۷۰ نوکلئوتید دارند و در ۵۰ نوکلئوتید یکسان هستند دمای ذوب خیلی نزدیک به هم و در حدود ۸۰ دارند.



شکل-۲. نمودار تکثیر miR-20a، miR-92a و miR-16. نمودار تکثیر در هر سه miR-20a، miR-92a و miR-16 بطور دقیق روی هم افتاده اند.



شکل-۳. عکس ژل miR-16، miR-92a و miR-20a به همراه نمونه NTC. نمونه های miR-16، miR-92a و miR-20a طول قطعه ای تقریبا ۷۰ نوکلئوتیدی دارند که در ژل آگارز قابل مشاهده است. در قسمت NTC هیچ باندی مشاهده نشده و نشان دهنده عدم آلودگی و عدم تکثیردایمر پرایمر می باشد.

آنالیزهای نرم افزاری و آماری: تست 1-sample Kolmogorov-smirnove (KS) نشان داد که داده های خام در سه گروه miR-92a در توزیع نرمال قرار دارد ولی miR-20a در توزیع نرمال قرار ندارد به همین خاطر برای آنالیز miR-92a در بین گروه‌ها از آزمایش Oneway استفاده شد و از تست Bonferroni برای تعیین $\Delta\Delta C^t$ بین گروه‌ها استفاده شد (جدول-

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

۲ و جدول-۳).

برای محاسبه ΔC^t در هر سه گروه از فرمول زیر استفاده گردید:

ΔC^t C^t= ژن مورد نظر C^t - ژن کنترل داخلی

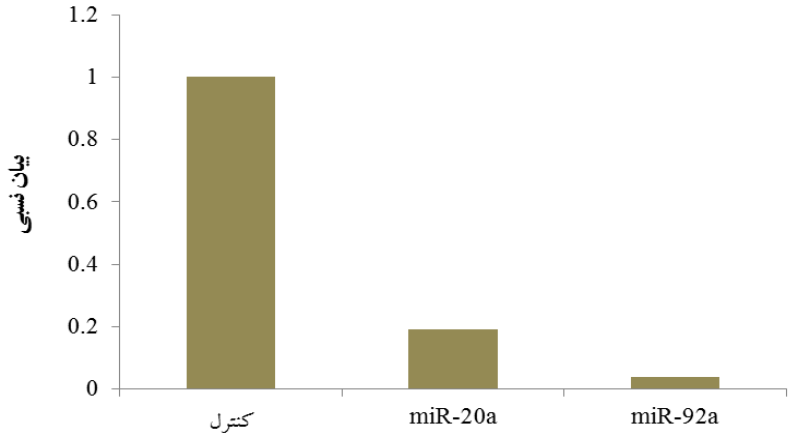
سپس برای محاسبه $\Delta\Delta C^t$ از فرمول زیر استفاده گردید:

$\Delta\Delta C^t$= C^t Δ-بیمار C^t Δنرمال

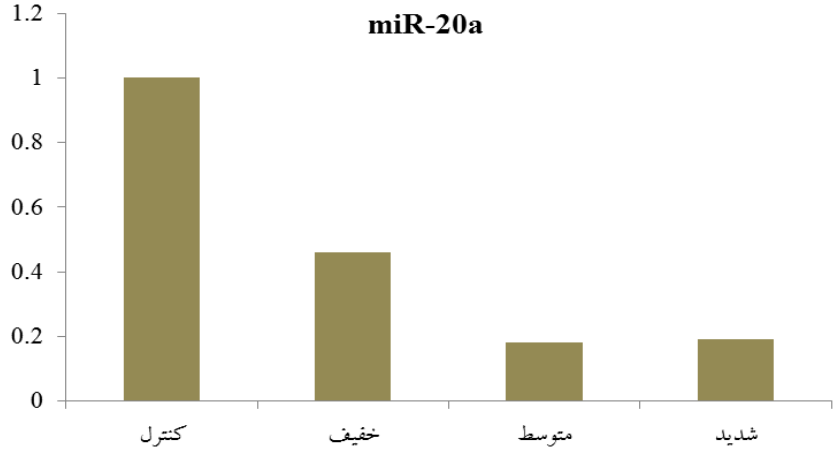
Relative expression= ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

برای آنالیز miR-20a از تست Nonparametrice و برای miR-92 از تست Mann-whitney استفاده گردید.

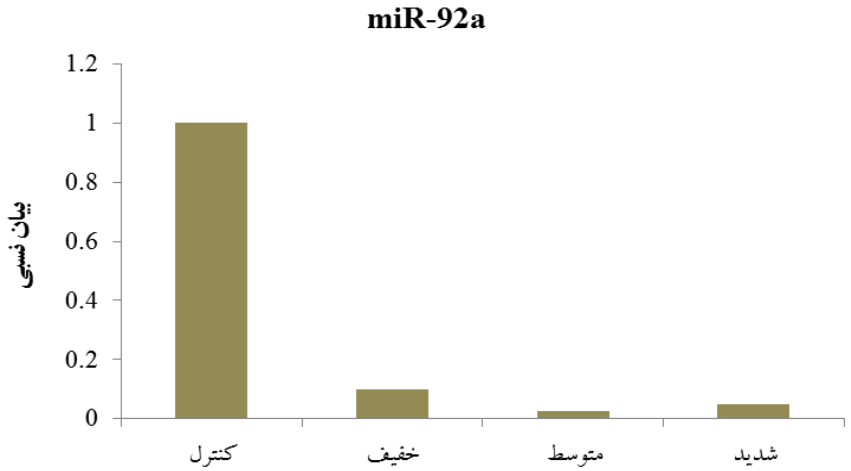
نتایج اختلاف معنی داری را در بیان هر دوی miR-92a و miR-20a بین بیماران و افراد سالم نشان دادند (نمودارهای ۱ تا ۳) (جداول ۲ تا ۳).



نمودار-۱. نمودار بیان نسبی miR-20a و miR-92a در بیماران تنفسی نسبت به نرمال کاهش یافته است ($p<0.05$).



نمودار-۲. نمودار بیان نسبی miR-20a در بیماران تنفسی نسبت به نرمال بر حسب شدت بیماری. بیان در هر سه گروه کاهش دارد. کاهش بیان در حالت متوسط بیش از همه بوده است ($p<0.05$).



نمودار-۳. نمودار بیان نسبی miR-92a در بیماران تنفسی نسبت به نرمال بر حسب شدت بیماری بیان در هر سه گروه کاهش شدیدی را نشان می دهد ($p<0.05$).

جدول-۲. میزان $\Delta\Delta C^t$ و بیان نسبی در miR-92a بیماران COPD و مصدومین شیمیایی نسبت به افراد نرمال

	$\Delta\Delta C^t$	Relative expression=($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	P Value
بیمار در مقایسه با نرمال	۶/۴	۰/۰۱۱	p<0.001

جدول-۳. میزان $\Delta\Delta C^t$ و بیان نسبی در miR-20a بیماران COPD و مصدومین شیمیایی نسبت به افراد نرمال

	ΔΔCt	Relative expression=(2-ΔΔCt)	P Value
بیمار در مقایسه با نرمال	۳/۰۴	۰/۱۲	p<0.05

بحث

کلاستر miR-17/92 عملکردهای متنوعی مثل رشد، تکثیر، مهاجرت، تهاجم، تسهیل متاستاز، ضد التهاب، ضد آپوپتوز، ضد رگزایی و ضد هایپوکسی را در بافت ها و سلول های مختلف انجام می دهد (۲۲, ۲۳).

در این مطالعه با استفاده از طراحی پرایمر stem-loop و تکنیک Real-time qRT-PCR بیان دو miR-20 و miR-92a از اعضای کلاستر miR-17/92 را به طور همزمان در سرم بیماران تنفسی با زمینه ژنتیکی و عوارض بالینی مشابه شامل COPD و مصدومین شیمیایی مورد بررسی قرار دادیم.

بیان نسبی miR-20a و miR-92a در این افراد نسبت به نرمال به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۰۴۹ بود که کاهش معنی داری را نشان می داد (نمودار ۱). بیان نسبی miR-20a در مراحل خفیف، متوسط و شدید بیماران نسبت به حالت نرمال کاهش یافته و به ترتیب مقادیر ۰/۴۶، ۰/۱۸، و ۰/۱۹ را نشان می دادند (نمودار-۲). بیان نسبی miR-92a در مراحل خفیف، متوسط و شدید بیماران نسبت به حالت نرمال مجددا کاهش شدیدی را در هر سه مرحله شدت بیماری خفیف، متوسط و شدید نشان می دادند و میزان کاهش نسبت به نرمال به ترتیب ۰/۱، ۰/۰۲۵، و ۰/۰۵ بود (نمودار-۳).

هرچند بیان miR-20a و miR-92a در بعضی سرطانها مثل سرطانهای دستگاه گوارش، پروستات، مثانه، تخمدان و ریه و بعضی بیماریها مثل بیماریهای قلبی و عروقی، و پری کلامپسی بررسی شده ولی این مطالعه اولین بار است که در سرم بیماران تنفسی با زمینه ژنتیکی و به طور همزمان در COPD و مصدومین شیمیایی انجام پذیرفته است (۲۴-۲۶).

اگرچه افزایش بیان کلیه اعضای این کلاستر به عنوان انکوژن در غالب سرطانها دیده شده اما بررسیهایی، نقش این کلاستر را در کاهش متاستاز و افزایش مقاومت به داروی سرطانی نیز نشان داده اند. به طوری که بر طبق یک بررسی جدید، کاهش بیان miR-17-5p، موجبات افزایش مقاومت به دارو را در NSCLC فراهم می سازد (۲۷, ۲۸). در همین راستا بررسی جالب دیگری با کمک میکرواری، ارتباط کاهش بیان دو خانواده miR-17 و miR-92 را با افزایش مقاومت به داروی سیس پلاتین در رده سلولی NSCLC گزارش نموده است (۲۹) و به طور کلی نقش این کلاستر را در خصوصیت مقاومت به دارو در هپاتوسلولار کارسینوما نیز نشان داده اند (۳۰). به علاوه، بررسیهای قبلی، نقش miR-20a را نیز در کاهش متاستاز و مقاومت به دارو نشان داده اند (۳۱, ۳۲). مطالعه ای در ۲۰۱۵، p53 را توجیهی برای این قضیه عنوان نموده است (۳۳). به نحوی که کاهش بیان خانواده پلی سیسترونی miR17/92 تنها در صورتی موجب حساسیت به دارو می شود که پیش از آن، p53 از بین رفته باشد. اگر تومور ساپرسور p53 حضور داشته باشد، کاهش بیان این دو miRNA که انکوژن هستند، نه تنها موجب افزایش حساسیت به دارو نمی شود، بلکه موجب ایجاد مقاومت نیز می گردد (۳۳). این در حالی است که نتیجه متناقضی در بررسی دیگری در رابطه با p53 گزارش گردیده است و آن این است که Yan و همکارانش نشان دادند که در قسمت پروگزیمال پروموتور کلاستر miR-17/92 یک جایگاه اتصال برای ژن p53 وجود دارد که در شرایط هایپوکسی، p53 انباشته شده به جایگاه اتصال در کلاستر miR-17/92 متصل می شود و موجب کاهش بیان این کلاستر گشته و منجر به آپوپتوز وابسته به هیپوکسی می گردد. آنها همچنین نشان دادند که نه تنها در شرایط هایپوکسی بلکه در استرسهایی مثل آسیب به DNA نیز از بیان کلاستر miR-17/92 کاسته شده و موجب افزایش بیان p53 و در نتیجه پیشبرد سلول به سمت آپوپتوز می گردد (۳۴).

با توجه به گستردگی چنین نتایج ضد و نقیضی در منابع موجود، بررسیهای بیشتر بر روی اعضای این کلاستر همچون تحقیق حاضر ضروری بوده و به واضحتر کردن دانسته های فعلی ما در زمینه نقش این miRNA ها و مسیرهای مولکولی درگیر با آنها در بیماریهای مختلف کمک شایانی خواهد نمود. به ویژه اینکه نقش تومور ساپرسوری اعضای این کلاستر به عنوان روی دیگری از سکه در برخی سرطانها مطرح شده است (۳۵) و این مسئله، مجددا لزوم تحقیق حاضر را بیشتر مورد تایید قرار می دهد.

در خصوص دو miRNA تحت بررسی نیز بررسیهای قبلی بر پایه مطالعات با توان بالا (High throughput) نتایج متناقضی را ارائه کرده اند. به گونه ای که، یک بررسی miR-92a را به عنوان یکی از مارکرهای معنادار برای افتراق (distinguishing factor) سرطان ریه از COPD معرفی نموده و miR-20a را نیز برای تمایز بین سرطان و فرد سالم و همچنین تمایز بین COPD و فرد سالم گزارش کرده است (۳۶). از طرف دیگر، بررسی دیگری، miR-92a را مارکر معناداری در این خصوص معرفی ننموده است (۳۷). یکی از دلایل این اختلاف را می توان به حساسیت و دقت کمتر روش هایی مانند میکرواری نسبت به روش ما ذکر نمود. به همین دلیل نتایج فعلی ما برای بیماریهای تنفسی از اهمیت ویژه ای

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

برخوردار است. نتایج تحقیق ما نیز نشان می دهد اعضای این کلاستر به ویژه miR-92a می تواند به طور کلی برای افتراق بیماریهای تنفسی واجد زمینه قوی ژنتیکی با سرطان ریه و/یا بیماریهای قلبی–عروقی به کار روند.

در این بررسی، بیان miR-20a و miR-92a مورد مطالعه قرار گرفت. پرایمرها طوری طراحی شده اند که اختصاصا ایزوفرمهای a و نه b این دو miRNA را شناسایی می کنند. بر طبق آنالیزهای انجام شده با DIANA-miRPath version 3.0، Has-miR-20a-5p قادر به هدف قرار دادن Hif-1-α بوده و تنها has-miR-92a-2-5p است که می تواند EPAS1 (Hif-2-α) را مورد هدف قرار دهد که البته پرایمرهای ما هردو ایروفرم ۱ و ۲ miRNA اخیر را شناسایی می کنند. هر دو مولکول Hif-1-α و Hif-2-α در مسیر سیگنالینگ هیپوکسی دخیل در بیماریهای تنفسی نقش کلیدی را بازی می کنند که احتمالا کاهش بیان این دو miRNA افزایش بیان این مولکولها را به عنوان فاکتورهای رونویسی و متعاقبا افزایش بیان مولکولهای فرودست آنها همچون VEGF را به دنبال خواهد داشت. رگ زایی یک آسیب مهمی در بسیاری از بیماریها مثل سرطان، بیماریهای التهابی، و بیماری های ریوی می باشد (۳۸). Agrawal R و همکاران نشان داند بیان ژن VEGF و HIF2a با بیان miR-20a رابطه معکوسی دارد و miR-20a آنتی هایپوکسی و مخالف رگزایی است لذا کاهش بیان miR-20a رگزایی را در بافت تحریک می کند (۳۹). Sato و همکاران ثابت کردند که در شرایط هایپوکسی مزمن ریوی بیان ژن VEGF و HIF2a بالا می رود. با توجه به هایپوکسی و رگزایی که در بیماری COPD و ریه مصدومین مواجهه با گاز خردل انجام می گیرد کاهش بیان miR-20a در این بیماران می تواند با افزایش بیان VEGF و HIF2a مرتبط باشد (۴۰). Murata و همکاران نشان دادند با مهار miR-92a می توان رگ زایی را در بافت هدف افزایش داد (۴۱).

کاهش بیان miR-20a و miR-92a موجب آپوپتوز، التهاب، رگزایی، هایپوکسی، مهار رشد و تکثیر سلول می شود هرچند miR-20 و miR-92a در سلولها و بافت های مختلف با واسطه ژنها و مسیرهای مختلفی این اعمال را انجام می دهد. همچنین نقش miR-92a در متاستاز سرطان NSCLC با واسطه افزایش ترانزیشن از اپی تلیال به سمت مزانشیمال یا EMT نیز مشخص گردیده است. بنابراین، کاهش این miRNA منجر به کاهش EMT و کاهش فیبروز و افزایش تولید موکوس می گردد. بدین نحو افزایش تولید موکوس که منجر به Bronchiolitis BO (Obliterans) گشته و یکی از دلایل مرگ و میر این بیماران تنفسی عنوان می گردد، بدین نحو قابل توجیه خواهد بود.

از سوی دیگر، WISP1 (WNT1-inducible signaling pathway protein 1) یک واسطه در فیبروز ریوی می باشد که یک جایگاه اتصال در سمت 3' UTR برای miR-92a دارد. در فیبروز ریوی بیان WISP1 افزایش دارد درحالی که بیان miR-92a کاهش می یابد. به طوری که، Berschneidera و همکاران نشان دادند که درفیبروز ریوی با کاهش miR-92a بیان WISP1 افزایش یافته و WISP1 نیز القا کننده TGF-B است که در فیبروز ریوی نقش مهمی را بازی می کند. بنابراین کاهش بیان miR-92a بطور معکوس موجب افزایش بیان TGF-B می گردد (۴۲). بدین گونه فیبروز مشاهده شده در این بیماران نیز قابل توجیه خواهد بود.

بررسی برخی مولکولهای تارگت و کلیدی این کلاستر به منظور شفاف سازی مسیرهای مولکولی درگیر در این بیماریهای تنفسی با زمینه نسبتا قدرتمند ژنتیکی توسط تیم تحقیقاتی حاضر، در حال انجام می باشد.

نتیجه‌گیری

کاهش معنادار بیان دو miRNA با نامهای miR-20a و miR-92a، می تواند در نتیجه تغییرات ژنومیک و/یا محیط و/یا اکوژنومیک (متاثر از اپی ژنومیک) باشد که تحقیقات آینده مسیر را روشنتر خواهد نمود. اعضای کلاستر انکوژن miR17/92 (با افزایش بیان در سرطان ریه)، قابلیت کاربرد بیومارکری در غربالگری غیر تهاجمی بیماریهای تنفسی را دارا هستند. اعضای کلاستر miR17/92 که به خوبی به عنوان یک انکوژن شناخته شده و در سرطانها افزایش بیان دارند، در بیماریهای تنفسی کاهش بیان یافته و می توانند به عنوان فاکتور افتراقی یا تمایز دهنده با سرطان ریه و بیماریهای قلبی–عروقی که غالبا نیز به عنوان بیماریهای همزمان با (به ویژه) COPD مطرح هستند نیز به کار روند. با استفاده از نتایج این تحقیق می توان روشهای جدیدی را در استراتژیهای درمانی بیماران تنفسی نیز، با هدف قرار دادن کلاستر مورد بررسی از جنبه های مختلف فوق، به کار گرفت.

تشکر و قدردانی: محققین از دکتر محمود ثالثی بابت کمک شایان در بررسی های آماری و دکتر قزوینی بابت همکاری در جمع آوری نمونه های این مقاله کمال تشکر را دارند. این مطالعه مستخرج از پایان نامه مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با شماره ثبت ۶–۲۰–۵۷ مورخ ۹۳/۶/۱۷ و شماره پرونده طرح"۲۷ ژ" و دارای کد اخلاق به شماره IR.BMSU.REC.1393.67 می باشد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می نمایند که هیچگونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

منابع

1. Burki TK. The economic cost of respiratory disease in the UK. Elsevier; 2017.
2. Garantziotis S, Schwartz DA. Ecogenomics of respiratory diseases of public health significance. Annual review of public health. 2010;31:37-51.
3. Vincent J-L. Individual gene expression and personalised medicine in sepsis. The Lancet Respiratory Medicine. 2016;4(4):242-3.
4. Alton EW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. The Lancet Respiratory Medicine. 2015;3(9):684-91.
5. Von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009;123(1):3-11.
6. Vahedian-Azimi A, Ebadi A, Ahmadi F, Saadat S. Delirium in prolonged hospitalized patients in the intensive care unit. Trauma monthly. 2015;20(2).
7. Meyers DA, Bleecker ER, Holloway JW, Holgate ST. Asthma genetics and personalised medicine. The Lancet Respiratory medicine. 2014;2(٥):٤٠٥-١٥.
8. Tanday S. Epigenetic study identifies genes linked to asthma and allergy. The Lancet Respiratory Medicine. 2015;3(4):274.
9. Liang L, Willis-Owen SA, Laprise C, Wong KC, Davies GA, Hudson TJ, et al. An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. Nature. 2015;520(7549):670.
10. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nature reviews Cancer. 2004;4(2):143.
11. Obeidat Me, Hao K, Bossé Y, Nickle DC, Nie Y, Postma DS, et al. Molecular mechanisms underlying variations in lung function: a systems genetics analysis. The Lancet Respiratory Medicine. 2015;3(10):782-95.
12. Silverman EK. How can genetics help? Smoking and COPD have one of the strongest relationships in clinical epidemiology. But don't forget the genetics. Nature. 2012;486(7417):S7-S.
13. Almagro P, Soriano JB. Underdiagnosis in COPD: a battle worth fighting. The Lancet Respiratory Medicine. 2017;5(5):367-8.
14. Quaak M, Van Schayck C, Knaapen A, Van Schooten F. Genetic variation as a predictor of smoking cessation success. A promising preventive and intervention tool for chronic respiratory diseases? European Respiratory Journal. 2009;33(3):468-80.
15. Weiss ST. Lung function and airway diseases. Nature genetics. 2010;42(1).
16. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marciante KD, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. Nature genetics. 2010;42(1):45-52.
17. Martz L. Susceptibility loci for COPD. SciBX: Science-Business eXchange. 2009;2(14).
18. Xie Z-K, Huang Q-P, Huang J, Xie Z-F. Association between the IL1B, IL1RN polymorphisms and COPD risk: A meta-analysis. Scientific reports. 2014;4:6202.
19. Ziółkowska-Suchanek I, Mosor M, Gabryel P, Grabicki M, Żurawek M, Fichna M, et al. Susceptibility loci in lung cancer and COPD: association of IREB2 and FAM13A with pulmonary diseases. Scientific reports. 2015;5.
20. Ferrarotti I, Luisetti M. COPD: no gene left unturned. The Lancet Respiratory medicine. 2014;2(3):171.
21. Alvanegh AG, Edalat H, Fallah P, Tavallaei M. Decreased expression of miR-20a and miR-92a in the serum from sulfur mustard-exposed patients during the chronic phase of resulting illness. Inhalation toxicology. 2015;27(13):682-8.
22. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature. 2005;435(7043):828-33.
23. 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 & development. 2009;23(24): 2806-11.
24. Li X, Zhang Z, Yu M, Li L, Du G, Xiao W, et al. Involvement of miR-20a in promoting gastric cancer progression by targeting early growth response 2 (EGR2). International journal of molecular sciences. 2013;14(8):16226-39.
25. Chang Y, Liu C, Yang J, Liu G, Feng F, Tang J, et al. MiR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma. Journal of hepatology. 2013;59(3):518-27.
26. Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, Hughes D, Kleinerman ES. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. Cancer research. 2012;72(4):908-16.
27. Zhang W, Lin J, Wang P, Sun J. miR-17-5p down-regulation contributes to erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cells. Journal of drug targeting. 2017;25(2):125-31.
28. Gong J, He L, Ma J, Zhang J, Wang L, Wang J. The relationship between miR-17-5p, miR-92a, and let-7b expression with non-small cell lung cancer targeted drug resistance. Journal of BU ON: official journal of the Balkan Union of Oncology. 2017; 22(2):454.
29. Zhao J, Fu W, Liao H, Dai L, Jiang Z, Pan Y, et al. The regulatory and predictive functions of miR-17 and miR-92 families on cisplatin resistance of non-small cell lung cancer. BMC cancer. 2015;15(1):731.
30. Awan FM, Naz A, Obaid A, Ikram A, Ali A, Ahmad J, et al. MicroRNA pharmacogenomics based integrated model of miR-17-92 cluster in sorafenib resistant HCC cells reveals a strategy to forestall drug resistance. Scientific Reports. 2017;7.
31. Fan M-Q, Huang C-B, Gu Y, Xiao Y, Sheng J-X, Zhong L. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor

Downloaded from militarymedj.ir at 11:57 +0330 on Monday October 22nd 2018

survival of hepatocellular carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2013;32(1):21.
32. Pu Y, Yi Q, Zhao F, Wang H, Cai W, Cai S. MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. Cancer cell international. 2016;16(1):64.
33. Borkowski R ,Du L, Zhao Z, McMillan E, Kosti A, Yang C-R, et al. Genetic Mutation of p53 and Suppression of the miR-17~ 92 Cluster Are Synthetic Lethal in Non–Small Cell Lung Cancer due to Upregulation of Vitamin D Signaling. Cancer research. 2015;75(4):666-75.
34. Yan Hl, Xue G, Mei Q, Wang Yz, Ding Fx, Liu MF, et al. Repression of the miR- 17- 92 cluster by p53 has an important function in hypoxia- induced apoptosis. The EMBO journal. 2009;28(18):2719-32.
35. Ottman R, Levy J, Grizzle WE, Chakrabarti R. The other face of miR-17-92a cluster, exhibiting tumor suppressor effects in prostate cancer. Oncotarget. 2016;7(45):73739.
36. Leidinger P, Keller A, Borries A, Huwer H, Rohling M, Huebers J, et al. Specific peripheral miRNA profiles for distinguishing lung cancer from COPD. Lung cancer. 2011;74(1):41-7.
37. Akbas F, Coskunpinar E, Aynacı E, Müsteri Oltulu Y, Yildiz P. Analysis of serum micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. Experimental lung research. 2012;38(6):286-94.
38. Willems-Widyastuti A, Alagappan VK, Arulmani U, Vanaudenaerde BM, de Boer WI, Mooi WJ, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces angiogenesis in vitro via VEGF production in human airway smooth muscle cells. Indian journal of biochemistry & biophysics. ۲۰۱۱;۴۸(۴):۲۶۲-۹.
39. Agrawal R, Pandey P, Jha P, Dwivedi V, Sarkar C, Kulshreshtha R. Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: insights from small RNA deep sequencing. BMC genomics. 2014;15:686.
40. Sato M, Tanaka T, Maeno T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, et al. Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells: role of Src family kinases-dependent pathway. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2002;26(1):127-34.
41. Murata K, Ito H, Yoshitomi H, Yamamoto K, Fukuda A, Yoshikawa J, et al. Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2014;29(2):316-26.
42. Berschneider B, Ellwanger DC, Baarsma HA, Thiel C, Shimbori C, White ES, et al. miR-92a regulates TGF-beta1-induced WISP1 expression in pulmonary fibrosis. The international journal of biochemistry & cell biology. 2014;53:432-41.