

مقایسه‌ی میزان بیان miR-24، miR-106a و miR-107 بین دوقلوهای همسان در سنین مختلف

منصوره عجمی^۱، دکتر امیر آتشی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳، منیره عجمی^۴، دکتر سعید کاویانی^۳

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه هماتولوژی atashia@modares.ac.ir

دریافت: ۹۳/۲/۲۱ پذیرش: ۹۳/۷/۶

چکیده

زمینه و هدف: افزایش سن مانند بسیاری از صفات پیچیده از تعامل میان ژنوم و شرایط محیطی حاصل می‌گردد و اپی‌ژنتیک به‌عنوان یک مکانیسم رابط مرکزی، این دو عامل را به هم مرتبط می‌سازد. تاکنون مطالعاتی برای یافتن صفات وابسته به سن و نشانگرهای زیستی که پیش‌بینی‌کننده‌ی طول عمر و خطر بروز مرگ می‌باشند انجام شده، اما هنوز هیچ توافق جامعی وجود ندارد. دوقلوهای همسان یک مدل مناسب برای مطالعه‌ی تغییرات اپی‌ژنتیک مرتبط با افزایش سن هستند. *miRNA* ها مولکول‌های تنظیم‌کننده‌ی کوچک ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی دخیل در فرایند افزایش سن شناخته شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی تفاوت بیان تعدادی از *miRNA* های مرتبط با افزایش سن در جفت دوقلوهای همسان بود.

روش بررسی: در این مطالعه تفاوت بیان *miR-24*، *miR-106a* و *miR-107* که ژن‌های هدفشان در تنظیم چرخه‌ی سلولی و فرایند افزایش سن نقش دارند، بر روی شش جفت دوقلوی همسان در دو رده‌ی سنی ۱۵ تا ۱۷ و ۴۵ تا ۵۰ سال با استفاده از روش *qRT-PCR* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان *miR-24*، *miR-106a* و *miR-107* بین دو رده‌ی سنی، تفاوت معنی‌داری (۲۲/۳۷ برابر) را نشان داد. میزان عدم تطابق در بیان هر سه *miRNA*، در مقایسه‌ی قل‌های اول با قل‌های دوم با افزایش سن افزایش یافت (۴۰۱/۷۳۳ برابر).

نتیجه‌گیری: افزایش بیان *miR-24*، *miR-106a* و *miR-107* می‌تواند عاملی جهت افزایش سن تلقی گردد. همچنین افزایش در تفاوت میزان بیان، طی افزایش سن، به خوبی تایید کننده‌ی اثرات محیط بر میزان بیان *miRNA* های دوقلوهای همسان می‌باشد.

واژگان کلیدی: دوقلو، اپی‌ژنتیک، *miRNA*، افزایش سن

مقدمه

پیچیده، افزایش سن نیز از تعامل میان ژنوم و شرایط محیطی حاصل می‌گردد و اپی‌ژنتیک به‌عنوان یک مکانیسم رابط مرکزی، این دو عامل را به هم مرتبط می‌سازد. افزایش سن

افزایش سن به‌صورت یک کاهش تدریجی در توانایی برای مقابله با چالش‌های فیزیولوژی که نهایتاً منجر به مرگ می‌گردد، مشخص می‌شود (۱). مانند بسیاری از صفات

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای تخصصی هماتولوژی، استادیار دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دیگر و ایجاد ارتباط میان سلول‌ها می‌شوند. اگزوزوم و miRNA ها در شبکه‌ی پیچیده‌ای که منجر به فرایند افزایش سن می‌گردد نقش ایفا می‌کنند (۱۱). بررسی سیستم‌های مدل‌سازی شده نشان می‌دهد که افزایش سن می‌تواند با تغییراتی در ژن‌ها و بیان پروتئین‌ها تنظیم گردد (۱۲). با افزایش سن تمایل به افزایش بیان بعضی از miRNA ها که باعث کاهش بیان ژن‌های هدفشان می‌گردد نشان می‌دهد که کنترل اپی‌ژنوم مرتبط با فرایند افزایش سن تا حدی توسط این miRNA ها صورت می‌گیرد (۱۳). شواهد اولیه در مورد نقش miRNA به‌عنوان یک فاکتور تنظیم کننده‌ی افزایش سن از مطالعه بر روی کرم‌های *C. elegans* به‌دست آمده است (۱۴). Lin-4 باعث افزایش طول عمر در این کرم‌ها می‌شود، در مقابل miR-1 و Let-7 با افزایش سن کاهش می‌یابند (۱۵). در یک مطالعه که توسط هکل و همکارانش بر روی چهار مدل سلولی با القا پیری به‌صورت *In Vitro* و سه نمونه ارگانلی گرفته شده از افراد پیر و جوان انجام شد، کاهش بیان چهار miRNA (miR-17, miR-29a, miR-106a, miR-19b) مرتبط با افزایش سن گزارش گردید (۱۶). نورن هوتن و همکارانش با بررسی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در دو جمعیت پیر و جوان کاهش بیان (miR-103, miR-107, miR-130a, miR-24, miR-128, miR-155, miR-221, miR-496, miR-1538) را مرتبط با افزایش سن گزارش کردند (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری، مقایسه پروفایل miRNA خون کامل در دو جمعیت با متوسط سن ۹۶/۴ و ۴۵/۹ به روش Microarray انجام شد. نتایج نشان می‌دهد از هشتاد miRNA که دارای تغییرات بیان مرتبط با افزایش سن بودند، شانزده مورد، افزایش و شصت و چهار مورد، دارای کاهش بیان می‌باشند (۱۷).

دوقلوهای همسان مدلی مناسب برای مطالعه‌ی تغییرات اپی‌ژنتیک هستند. طی افزایش سن، یک فرد به تدریج دستخوش تغییراتی می‌شود که قل دیگرش با ژنتیک یکسان ممکن است این تغییرات را به‌گونه‌ای متفاوت نشان دهد.

یک روند طبیعی است که تمام افراد در طول زندگی خود با آن مواجه می‌شوند. هرچند عوامل وراثتی ممکن است در ابتدا تعیین کننده‌ی طول عمر یک فرد باشد، شرایط محیطی می‌تواند در طول زمان به‌طور موثری بر فرایند افزایش سن تاثیرگذار باشد (۲). رشد و تکامل موجودات زنده با تغییرات هماهنگ و منظم اپی‌ژنتیکی در طول زمان تنظیم می‌گردد، هر چند بعضی تغییرات اپی‌ژنتیکی فاقد نقش شناخته شده در این فرایند می‌باشد (۳). یکی از مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی موثر، متیلاسیون DNA است. در سلول‌های طبیعی به‌طور نرمال ۷۰ تا ۹۰ درصد جایگاه‌های CPG به‌صورت متیله هستند در صورتی که جزایر CPG که معمولاً در پروموتور ژن‌ها قرار دارند به‌صورت غیر متیله می‌باشند (۴). این الگوی متیلاسیون در روند افزایش سن به‌صورت معکوس دیده می‌شود یعنی متیلاسیون کلی در بسیاری از بافت‌ها کاهش داشته و تعداد زیادی از جزایر CPG هاپیر متیله می‌گردند (۳). دومین مکانیسم اپی‌ژنتیک که بر افزایش سن و طول عمر تاثیر می‌گذارد، تغییرات هیستونی بعد از ترجمه است (۵). تغییرات هیستونی بعد از ترجمه در کرم‌ها و مگس‌ها مورد بررسی قرار گرفته شد و نتایج نشان دادند که این عامل اپی‌ژنتیکی طی افزایش سن متحمل تغییر می‌گردند (۶). از miRNA ها به عنوان دیگر مکانیسم اپی‌ژنتیکی دخیل در فرایند افزایش سن یاد می‌شود (۷). miRNA ها مولکول‌های کوچک ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که بیان ژن هدف خود را بعد از رونویسی تحت تاثیر منفی قرار می‌دهند و با اتصال به mRNA هدف خود باعث ناپایداری یا کاهش آن می‌گردند (۸). miRNA ها می‌توانند به‌عنوان عاملی تنظیم کننده در بسیاری از فرایندهای سلولی شامل تکثیر و بقا، تمایز، رونویسی، پیری و افزایش سن ایفای نقش کنند (۹). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که در طی فرایند افزایش سن بیان miRNA ها دچار تغییر می‌گردند (۱۰). miRNA های موجود در اگزوزوم باعث انتقال اطلاعات از سلولی به سلول

دیابت، فشار خون و بیماری‌های قلبی مصرف نمی‌کردند. تا حد امکان سعی شد دوقلوهای انتخاب شده، در شرایط محیطی یکسان زندگی کرده و رشته‌ی تحصیلی و شرایط شغلی مشابهی داشته باشند. برای تعیین و اثبات همسان بودن دوقلوهای شرکت کننده در مطالعه، فرم پرسشنامه‌ای شامل تعدادی سوال‌های تایید شده (۱۹) توسط والدین تکمیل گردید. پاسخ‌های هر بخش از پرسشنامه نمره بندی شده و در نهایت جمع نهایی، تعیین کننده‌ی همسان و یا ناهمسان بودن می‌باشد. نمره بالای ۰/۷ به عنوان دوقلوی ناهمسان و نمره‌ی پایین ۰/۶۴ به عنوان دوقلوی همسان در نظر گرفته شد، در حالی که نمره مابین ۰/۶۴-۰/۷ قابلیت تمایز همسان از ناهمسان را ندارد.

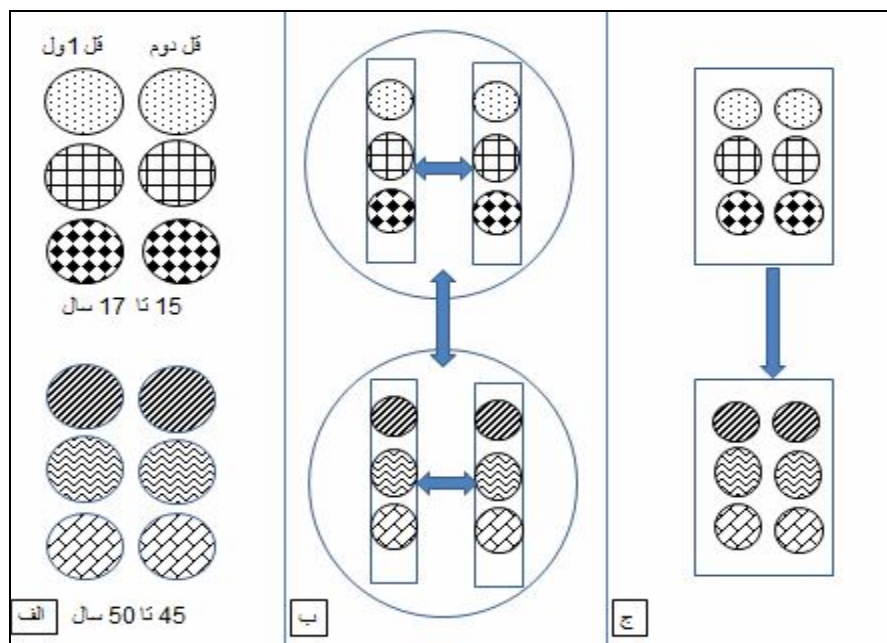
چگونگی مقایسه میزان تطابق بیان miRNA های مورد نظر در دوقلوهای هر رده‌ی سنی و مقایسه با رده‌ی سنی دیگر به صورت الگوار طراحی شد (شکل ۱).

(۱۸). استفاده از نمونه‌های دوقلو با ایجاد پل می‌تواند شکاف موجود میان فعالیت ژنی و محیط را از طریق مکانیسم‌های اپیژنتیک از بین ببرد (۲). بر اساس مطالعات ذکر شده، مشترکات miRNA های بررسی شده یعنی miR-107، miR-106 و miR-24، انتخاب و میزان تفاوت بیانشان روی نمونه‌ی خون محیطی شش جفت دوقلوی همسان در دو رده‌ی سنی ۱۵ تا ۱۷ و ۴۵ تا ۵۰ سال مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه و شرکت کنندگان در مطالعه: دو میلی‌لیتر از

نمونه‌ی خون محیطی ۶ جفت دوقلوهای همسان در دوره سنی ۱۵ تا ۱۷ و ۴۵ تا ۵۰ سال با رضایت‌نامه‌ی کتبی تهیه شد. دوقلوهای شرکت کننده در این مطالعه همگی از سلامت کامل برخوردار بوده و حتی هیچ گونه دارویی برای بیماری‌های



شکل ۱: چگونگی مقایسه دوقلوهای مورد بررسی در مطالعه، الف، شش جفت دوقلوی همسان در دو رده سنی ۱۵ تا ۱۷ و ۴۵ تا ۵۰ سال. ب، مقایسه بیان miRNA ها میان قل‌های اول هر رده سنی با قل‌های دوم در همان رده سنی و مقایسه میزان عدم تطابق بیان miRNA ها در دوقلوهای همسان در دو رده سنی متفاوت. ج، بررسی تفاوت بیان miRNA ها با افزایش سن.

(طول موج جذبی RNA) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذبی پروتئین) با دستگاه بیوفتومتر بررسی شد. مقدار OD ۲۸۰/۲۶۰ بیانگر میزان آلودگی با پروتئین است و اگر از ۱/۷ بیشتر باشد، میزان آلودگی با پروتئین کمتر خواهد بود. از طرفی غلظت RNA نیز با دستگاه بیوفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنتز cDNA و سنجش miRNA: سنتز cDNA و سنجش miRNA با استفاده از miRNA QRT-PCR Detection Kit (Stratagen, America) انجام گرفت. در ابتدا به منظور اضافه کردن دم پلی A به انتهای ۳' miRNA به ازای هر نمونه به ترتیب ۴ میکرولیتر پلی A پلیمرزبافر، ۱ میکرو لیتر (۱۰) میلی مول tATP، ۱ میکرو گرم RNA تام در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و مخلوط واکنش با آب مقطر RNase-Free به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید (البته با احتساب یک میکرولیتر آنزیمی که بایستی در گام بعد اضافه شود). نمونه‌ها بدون ورتکس کردن، به آرامی مخلوط شده و با برنامه دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شدند پس از اجرای انکوباسیون فوق، نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ قرار داده شدند.

به منظور واکنش سنتز cDNA به ازای هر نمونه، ۲ میکرولیتر RT بافر ۱۰X، ۴ میکرو لیتر از محصول مرحله اول، ۰/۸ میکرو لیتر (۱۰۰ میلی‌مول) dNTP، ۱ میکرو لیتر پرایمر آداپتور RT و ۱ میکرولیتر آنزیم RT به میکروتیوپ‌های RNase-Free اضافه کرده و حجم نهایی با ۱۱/۲ آب RNase-Free به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از مخلوط نمودن آرام ترکیبات هر میکروتیوپ، ابتدا برای ۵ دقیقه در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و به دنبال آن ۱۵ دقیقه در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس برای ۳۰ دقیقه در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور فعالیت رونویسی معکوس، باقی مانده و در نهایت برای خاتمه دادن به فعالیت رونویسی معکوس،

استخراج RNA تام به روش دستی و با بهره‌گیری از RNX™(plus) برپایه فنل-کلروفرم؛ به ازای هر ۱۰^۶ سلول ۲۰۰ میکرولیتر از RNX™- Plus Solution (سیناکلون، ایران) استفاده شد. بعد از ورتکس یک دقیقه‌ای، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. به ازای هر یک میلی‌لیتر نمونه، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و یک دقیقه به شدت تکان داده شد. سپس ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با بهره‌گیری از سانتریفوژ یخچال دار انجام شد. از سه فاز تشکیل شده، فاز بی‌رنگ رویی حاوی RNA با دقت به طوری که به دو فاز زیرین آلوده نشود، جدا شده و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری RNase-Free جدیدی منتقل شد. هم حجم محلول جداشده به آن اتانول ۱۰۰ درصد سرد اضافه و به آرامی مخلوط شده و به مدت یک شبانه روز (Overnight) در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سانتریفوژ به مدت ۴۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ یخچال‌دار انجام و سپس محلول رویی، دور ریخته شد. رسوب سفید رنگ در انتهای میکروتیوپ، با یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو و سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شده، ۱۰ دقیقه زمان داده شد تا رسوب مورد نظر خشک شود. در انتها، حدود ۳۰ میکرولیتر آب مقطر RNase-Free به هر نمونه افزوده و پیتاز گردید.

کنترل کیفی RNA استخراج شده: برای انجام کنترل کیفی RNA استخراج شده، ابتدا ۵ میکرولیتر از RNA روی ژل آگارز ۲ درصد که در شرایط RNase-Free تهیه شده بود الکتروفورز گردید و سالم بودن باندهای ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد به منظور ارزیابی میزان آلودگی RNA استخراج شده با پروتئین، میزان جذب محصول استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر

۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. در پایان، ۲۸۰ میکرولیتر آب RNase-Free به محصول هر واکنش افزوده شد و نمونه‌ها برای انجام بررسی‌های بعدی با Real Time RT-PCR در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند.

Real Time RT-PCR: پس از انجام آزمون‌های کیفی، اندازه‌گیری تغییرات بیان کمی و دقیق miRNA های استخراج شده از نمونه‌ی خون محیطی دوقلوهای همسان، با تکنیک Real Time RT-PCR و با استفاده از miRNA QRT-PCR Detection Kit (Stratagen, America) انجام گرفت. رنگ فلوئورسنت Eva Green موجود در Master Mix کیت مذکور، همانند SYBR Green یک رنگ متصل شونده به DNA دو رشته‌ای است که نیاز به استفاده از پروب‌های اختصاصی را برای شناسایی محصولات، رفع می‌نماید و در مقایسه با SYBR Green از خاصیت فلوئورسانس و اختصاصیت بیشتری برخوردار است. رنگ مرجع موجود در کیت نیز می‌تواند در واکنش Real time مورد استفاده قرار گیرد و عملکرد آن نرمال سازی و از بین بردن تفاوت‌های فلوئورسانس غیر وابسته به مقادیر، در میان

نمونه‌های مورد آزمایش می‌باشد. برای استفاده از رنگ مذکور، در ابتدا آن را به میزان ۱:۵۰ با آب Nuclease-Free رقیق کرده و آنگاه برای هر نمونه به میزان ۰/۳۷۵ میکرولیتر همراه با ۱۲/۵μl 2X miRNA QPCR master mix، ۱ میکرولیتر پرایمر روبه‌جلو اختصاصی (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت) با یکدیگر ترکیب شد. حجم نهایی با آب مقطر RNase-Free به ۲۵ رسانده شده که این مقدار، ۱ میکرو لیتر cDNA اضافه شده در مرحله‌ی آخر را نیز در بر می‌گیرد. پیش از قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه ترمال سایکل Real Time RT-PCR (Applied Biosystem)، محتوای میکروتیوپ‌ها به آرامی به‌طوری‌که حباب نگیرند مخلوط شد (بدون ورتکس) و انکوباسیون ابتدا در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه (تنها برای دور اول) سپس دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه و در نهایت دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه برای ۴۰ دور متوالی انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real Time RT-PCR در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای رو به جلو طراحی شده جهت تشخیص میزان بیان ژن های مورد بررسی

miRNA	Primer-F	TM	Length
hsa-miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATC	57.1 °C	22
hsa-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAA	56.5 °C	19
hsa-miR-106a-5p	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	55.3 °C	23
U6	AAATTGGAACGATACAGAGAAG	57.87	22

یافته‌ها

نتیجه اندازه‌گیری کمی برای بررسی تفاوت بیان miR-107، miR-24، miR-106a: در مطالعه‌ی حاضر پس از استخراج RNA از نمونه‌ی خون محیطی دوقلوهای همسان و بررسی‌های کمی و کیفی آن، سنتز cDNA از نمونه

خون محیطی دوقلوهای همسان انجام شد. واکنش Real Time RT-PCR روی cDNA مورد نظر توسط ABI Step One انجام گرفت. میزان بیان miRNA های مورد نظر نسبت به بیان U6 به‌عنوان کنترل داخلی، نرمال سازی شد. $\Delta Ct = Ct \text{ miRNA of interest} - Ct U6$

دوقلوهای ۱۵ تا ۱۷ سال نسبت به جفت دوقلوهای ۴۵ تا ۵۰ سال بررسی شد.

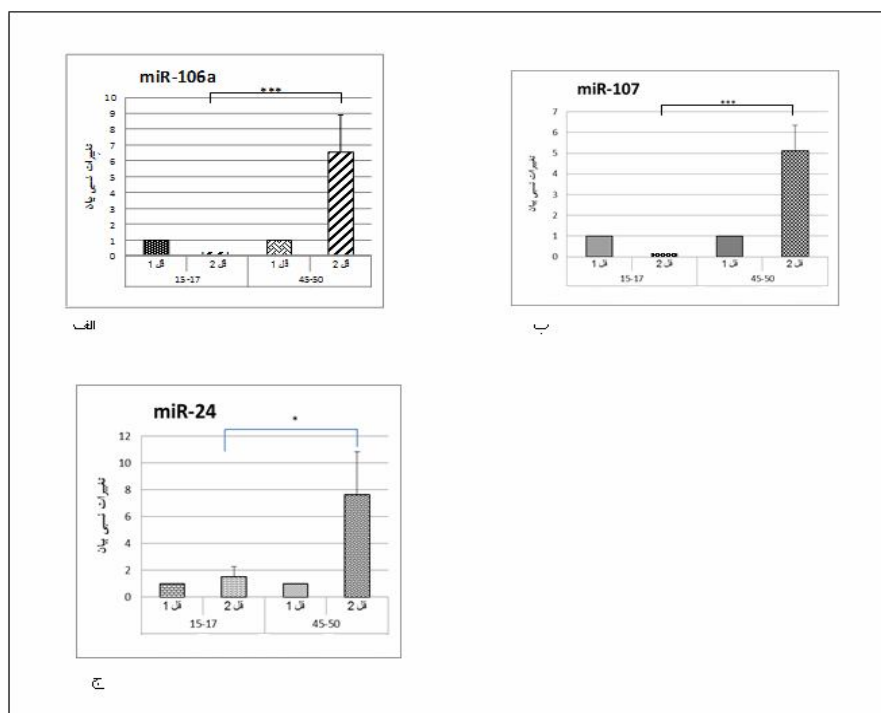
عدم تطابق بیان miR-24، miR-107، و miR-106a در بین قل‌های اول نسبت به قل‌های دوم در هر دو رده‌ی سنی مشاهده شد، اما این عدم تطابق تنها در رده‌ی سنی ۴۵ تا ۵۰ سال از نظر آماری معنی‌دار بود (P-value به‌ترتیب برای miR-24، miR-107، و miR-106a: <0/05، <0/01 و <0/01). میزان عدم تطابق بیان در بین قل‌های اول نسبت به قل‌های دوم در رده‌ی ۴۵ تا ۵۰ سال نسبت به رده‌ی ۱۵ تا ۱۷ سال افزایش داشت که این افزایش در همه miRNA ها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت (P-value به‌ترتیب برای miR-24، miR-107، و miR-106a: <0/05، <0/001 و <0/001) (شکل ۲).

سپس بر اساس مقایسه‌های مورد نظر بین دوقلوها در دو رنج سنی یاد شده و با استفاده از مدل $\Delta\Delta CT$ که روشی برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها است، بررسی تفاوت در تغییرات بیان miRNA های مورد نظر انجام گرفت.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ sample1} - \Delta CT \text{ sample2}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Relative Fold Change in gene expression level}$$

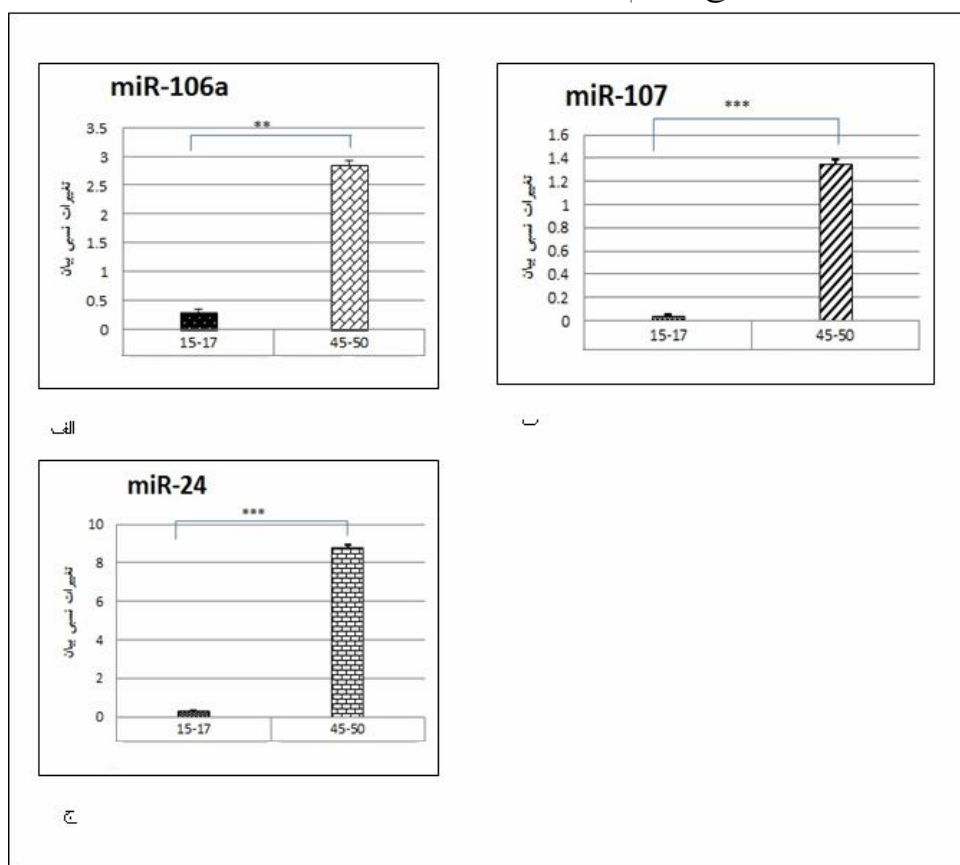
نتایج حاصل از بررسی تفاوت بیان miRNA های miR-24، miR-107، و miR-106a در مقایسه قل‌های اول با قل‌های دوم با افزایش سن؛ طبق روند توضیح داده شده در طراحی مطالعه (شکل ۱-ب) ابتدا تفاوت در میزان بیان miR-24، miR-106a، miR-107 بین قل‌های اول هر رده‌ی سنی با قل‌های دوم در همان رده‌ی سنی ارزیابی شده و سپس میزان عدم تطابق بیان miRNA های مذکور در جفت



شکل ۲: تاثیر افزایش سن بر میزان عدم تطابق بیان miRNA ها مابین قل‌های اول نسبت به قل‌های دوم. انحراف از میانگین به‌صورت SEM محاسبه شده است (P-value به‌ترتیب برای miR-24، miR-107، و miR-106a: <0/05، <0/001 و <0/001) (الف) miR-106a (ب) miR-107 (ج) miR-24

بیان miRNA های miR-106a، miR-24 و miR-107 در رده‌ی ۴۵ تا ۵۰ سال نسبت به رده‌ی سنی ۱۵ تا ۱۷ سال افزایش داشت که این افزایش بیان به ترتیب با $p\text{-value} < 0/01$ ، $< 0/001$ و $< 0/001$ از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از بررسی تفاوت بیان miRNA های miR-24، miR-106a و miR-107 با افزایش سن: در ادامه بدون در نظر گرفتن نسبت دوقلویی در نمونه‌ها، بررسی تغییرات بیان miRNA های مورد نظر در دو رده‌ی سنی بر اساس شکل الگووار طراحی مطالعه (شکل ۱- ج) انجام گرفت.



شکل ۳. تاثیر افزایش سن بر تفاوت بیان miRNA ها، انحراف از میانگین به صورت SEM محاسبه شده است. (p-value به ترتیب برای miR-106a، miR-24 و miR-107: $< 0/01$ ، $< 0/001$ و $< 0/001$ الف) miR-106a، ب) miR-107، ج) miR-24.

بحث

روند مولکولی شامل کوتاه شدن تلومر، آسیب DNA، فروپاشی ساختار ارگانل و سلول و تغییرات بیان ژن‌ها می‌باشد (۲۲). موجودات پیچیده دارای عملکردهای ژنی متفاوت در طول زندگی خود و مرتبط با مرحله‌ای که در آن قرار دارند می‌باشند، در هر یک از این مراحل یکسری از فرایندهای مولکولی تضمین کننده‌ی نیازهای ارگانیسم در آن سن می‌باشد (از تمایز سلولی در طی مرحله رشد و نمو تا

افزایش سن روند پیچیده‌ای است که منجر به یکسری عملکردهای بیولوژیکی در ارگانیسم‌ها می‌شود (۲۰) و پیامد آن افزایش استعداد ابتلا به بیماری و مرگ است (۲۱). اگر چه اساس مولکولی افزایش سن و پیری در حال حاضر در بسیاری از مدل‌های تجربی بررسی شده است، هیچ نظریه‌ی جامعی که توضیح دهنده‌ی روند پیری باشد وجود ندارد. این

که توسط الشاروی به مقایسه‌ی پروفایل miRNA خون کامل در دو جمعیت با متوسط سن ۹۶/۴ و ۴۵/۹ سال به روش Microarray پرداخته شد، نتایج حاکی از کاهش بیان miRNA های miR-106a، miR-24، و miR-107 با افزایش سن بود (۱۷).

این تفاوت در نتایج بررسی‌های انجام شده بر میزان بیان miRNA ها در روند افزایش سن را می‌توان به عوامل متعددی نسبت داد از جمله تفاوت در نوع سلول‌های مورد بررسی (سلول‌های لنفوسیت و یا کل سلول‌های خون محیطی)، رده‌های سنی متفاوت انتخاب شده (در مطالعه‌ی حاضر گروه‌های سنی انتخاب شده کمتر از ۵۰ سال سن داشتند، در حالی‌که به‌طور مثال مطالعه الشاروی رده‌ی سنی بالای ۵۰ سال را مورد بررسی قرار داده بودند)، و یا حتی اقلیم متفاوتی که افراد در آن زندگی می‌کنند. افراد شرکت کننده در این مطالعه از جمعیت سالمی که داروی خاصی مصرف نمی‌کردند انتخاب گردیدند در حالی‌که این تعریف در سایر مطالعات ذکر نشده بود. دلیل دیگر تفاوت در نتایج، تکنیک‌های متفاوت مورد استفاده در این مطالعات بود.

دوقلوهای همسان مدل مناسبی برای مطالعه‌ی تغییرات اپی ژنتیک مرتبط با افزایش سن هستند. تا به امروز شواهد متناقضی از عدم تطابق ژنتیک و اپی ژنتیک در دوقلوهای همسان در سنین کودکی گزارش شده است. به‌طور کلی عدم تطابق فنوتیپی بین دوقلوهای همسان را به محیط‌های غیر مشترکی که در طول زندگی با آن مواجه می‌شوند نسبت می‌دهند. عامل افزایش سن به عنوان فاکتوری مهم در افزایش میزان عدم تطابق در مطالعات انجام شده مورد توافق است (۳۰). اپی ژنوم حالتی پویا داشته و مرتبط و متأثر از تغییرات محیط است (۳۱). مطالعات زیادی در تایید نقش اپی ژنتیک به‌عنوان عامل کلیدی در عدم تطابق دوقلوهای همسان مطرح شده است (۳۳ و ۳۲ و ۳۰، ۱۸). تحقیقات جدید با نگاه دقیق‌تری به بررسی دلایل عدم تطابق در دوقلوهای همسان

حفظ و نگهداری سیستم‌های حیاتی موجود زنده در بزرگسالی (۲۳). محققین فاکتورهای اپی ژنتیک را شامل CPG متیلاسیون، تغییرات هیستون و RNA های غیرکدشونده مثل miRNAs به‌عنوان عاملی برای کنترل مرکزی تغییرات بیان ژن‌ها و ناپایداری ژنوم در طی افزایش سن پیشنهاد دادند (۲۴). تغییرات بیان miRNA ها با افزایش سن در مدل‌های موشی و در نمونه‌ی کبد و مغز نیز تایید شده است (۲۵-۲۸). افزایش سن در سلول‌ها عمدتاً توسط P53-P21 و P16-PRB که از مسیرهای تنظیم کننده‌ی سرعت چرخه‌ی سلول می‌باشند کنترل می‌گردد. miRNA های انتخاب شده در این مطالعه باهدف قرار دادن miRNA ژن‌های P16، P21، CDK6 در روند افزایش سن ایفای نقش می‌کنند. به‌دلیل ملاحظات اخلاقی و همچنین محدودیت‌های زمانی، بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه‌ی افزایش سن به‌صورت آزمایشگاهی و روی مدل‌های حیوانی انجام گرفته است. در مطالعه‌ی حاضر بررسی‌ها روی نمونه‌ی خون کامل انجام گرفته و نشان داده شد که افزایش سن باعث افزایش بیان miRNA های miR-106a، miR-24، و miR-107 می‌گردد که این یافته در هماهنگی با مطالعه‌ای است که افزایش بیان miR-107 را در رده‌ی سلول‌های سرطانی ریه‌ی انسان مسوول مهار رونویسی و ناپایداری CDK6 دانسته که باعث مهار چرخه‌ی سلولی و افزایش سن می‌گردد (۲۹ و ۲۳). بر خلاف افزایش بیان miRNA های مورد بررسی در این مطالعه، هوتن و همکارانش با بررسی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در دو جمعیت پیر و جوان (۶۹-۳۰ سال) کاهش بیان miR-107 و miR-24 را گزارش کردند. نتایج نشان داد که بیان تعدادی از miRNA ها و ژن‌های هدفشان متأثر از افزایش سن می‌باشد، با پیش‌بینی مسیرهای مولکولی احتمالی مرتبط بیان کردند که این miRNA ها در تنظیم و کنترل سرطان نقش داشته و کاهش بیانشان با افزایش سن احتمال ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری

می‌پردازد. یکی از راه‌های کنترل بیان miRNA ها، اپی ژنتیک می‌باشد و بالعکس بعضی از مکانیسم‌های اپی ژنتیکی تحت تنظیم miRNA ها هستند (۳۵ و ۳۴). با در نظر گرفتن این ارتباط می‌توان تفاوت در میزان بیان miRNA را نیز عاملی جهت عدم تطابق در دوقلوهای همسان دانست. در این مطالعه تفاوت در میزان بیان miRNA های miR-106a، miR-24 و miR-107 که همگی مرتبط با فرایند افزایش سن هستند، در دوقلوهای همسان بررسی شد. با وجود شرایط محیطی مشابه با افزایش سن میزان عدم تطابق در بیان miRNA های مذکور به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این امر نشان دهنده‌ی این حقیقت است که حتی جزئی‌ترین تفاوت در شرایط محیطی که ممکن است در نگاه اول قابل چشم پوشی باشد، تفاوت در میزان بیان miRNA ها را منجر می‌شود که تجمع این تفاوت بیان در طول زمان و با افزایش سن می‌تواند از عوامل اصلی عدم تطابق در دوقلوهای همسان در سنین بالاتر محسوب گردد.

نتیجه گیری

عوامل دخیل در فرایند افزایش سن می‌توانند به‌عنوان فاکتورهای پیش‌آگهی دهنده‌ی بیماری‌های مرتبط با افزایش سن نیز محسوب شوند. دوقلوهای همسان با داشتن ماده‌ی ژنتیکی یکسان می‌توانند نقش موثری در بررسی تاثیر شرایط

محیطی بر روند افزایش سن ایفا کنند. شرایط محیطی از طریق مکانیسم‌های اپی ژنتیکی بر میزان بیان ژن‌ها از جمله miRNA ها تاثیر گذار است. اهمیت اثر شرایط محیطی تا حدی است که به وضوح با افزایش سن و تجمع تاثیرات آن، باعث افزایش عدم تطابق در بیان miR-106a، miR-24 و miR-107 مرتبط با چرخه‌ی سلولی و فرایند پیری در دوقلوهای همسان می‌گردد. نتیجه‌ی دیگر برگرفته از این مطالعه یعنی افزایش بیان miR-106a، miR-24 و miR-107 با افزایش سن نیز مساله‌ای حایز اهمیت است و با بررسی‌ها و مطالعات بیشتر می‌تواند تاییدی باشد بر این نظریه که RNA های غیر کد شونده می‌توانند به‌عنوان یک افق جدید در تحقیقات آینده با هدف به تاخیر انداختن روند پیری و گسترش امید به سلامت در نظر گرفته شوند (۲).

تشکر و قدر دانی

این پژوهش در قالب پایان نامه دانشجویی در گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. بدین‌وسیله بر خود لازم می‌دانیم از زحمات این عزیزان و نیز انجمن دوقلوها و چندقلوهای پارسی که در معرفی دوقلوها در گروه‌های سنی مختلف نهایت همکاری را داشته‌اند، تقدیر و تشکر نماییم.

References

- 1- Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. Molecular biology of aging. *Cell*. 1999; 96: 291-302.
- 2- Tan Q, Christiansen L, Thomassen M, Kruse TA, Christensen K. Twins for epigenetic studies of human aging and development. *Ageing Res Rev*. 2013; 12: 182-7.
- 3- Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. Aging epigenetics: causes and consequences. *Mol Aspects Med*. 2013; 34: 765-81.
- 4- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2042-54.
- 5- Han S, Brunet A. Histone methylation makes

- its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* 2012; 22: 42-9.
- 6- Maures TJ, Greer EL, Hauswirth AG, Brunet A. The H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent manner. *Aging cell.* 2011; 10: 980-90.
- 7- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148-59.
- 8- Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60.
- 9- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431: 350-5.
- 10- Kato M, Chen X, Inukai S, Zhao H, Slack FJ. Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA.* 2011; 17: 1840-20.
- 11- Xu D, Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65: 368-75.
- 12- Hooten NN, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. MicroRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One.* 2010; 5: e10724.
- 13- Liang R, Bates DJ, Wang E. Epigenetic control of microRNA expression and aging. *Curr Genomics.* 2009; 10: 184-93.
- 14- Kato M, Slack FJ. microRNAs: small molecules with big roles—*C. elegans* to human cancer. *Biol Cell.* 2008; 100: 71-81.
- 15- Ibáñez-Ventoso C, Yang M, Guo S, Robins H, Padgett RW, Driscoll M. Modulated microRNA expression during adult lifespan in *caenorhabditis elegans*. *Aging cell.* 2006; 5: 235-46.
- 16- Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging cell.* 2010; 9: 291-6.
- 17- ElSharawy A, Keller A, Flachsbarth F, et al. Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging cell.* 2012
- 18- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 10604-9.
- 19- Price TS, Freeman B, Craig I, Petrill SA, Ebersole L, Plomin R. Infant zygosity can be assigned by parental report questionnaire data. *Twin Res.* 2000; 3: 129-33.
- 20- Berdasco M, Esteller M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging cell.* 2012; 11: 181-6.
- 21- Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 2010; 20: 434-9.
- 22- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell.* 2008; 135: 907-18.
- 23- Lanceta J, Prough RA, Liang R, Wang E.

- MicroRNA group disorganization in aging. *Exp Gerontol.* 2010; 45: 269-78.
- 24- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006; 124: 315-29.
- 25- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136: 215-33.
- 26- Maes OC, An J, Sarojini H, Wang E. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129: 534-41.
- 27- Bates DJ, Li N, Liang R, et al. MicroRNA regulation in ames dwarf mouse liver may contribute to delayed aging. *Aging cell.* 2010; 9: 1-18.
- 28- Li N, Bates DJ, An J, Terry DA, Wang E. Up-regulation of key microRNAs, and inverse down-regulation of their predicted oxidative phosphorylation target genes, during aging in mouse brain. *Neurobiol Aging.* 2011; 32: 944-55.
- 29- Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, Hashimoto T, Daub CO, Yasuda J. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non smallcell lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2009; 4: e6677.
- 30- Czyz W, Morahan JM, Ebers GC, Ramagopalan SV. Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences. *BMC Med.* 2012; 10: 93.
- 31- Wong C, Caspi A, Williams B, et al. A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics.* 2010; 5: 516-26.
- 32- Talens RP, Christensen K, Putter H, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging cell.* 2012; 11: 694-703.
- 33- Kaminsky ZA, Tang T, Wang S-C, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet.* 2009; 41: 240-5.
- 34- Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell.* 2006; 9: 435-43.
- 35- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004; 429: 457-63.

Comparison of miR-24, miR-106a and miR-107 Expression in Identical Twins of Different Ages

Ajami M¹, Atashi A¹, Soleimani M¹, Ajami M², Kaviani S¹

¹Dept of Hematology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

²Dept of Hematology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Corresponding Author: Atashi A, Dept of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E-mail: atashia@modares.ac.ir

Received: 11 May 2014 **Accepted:** 28 Sep 2014

Background and Objective: Aging like many complex traits is the result of interaction between genome and environmental factors and epigenetic mechanisms as a central connector links these two markers. So far, investigations on age-related characteristics and biomarkers predicting survival and risk of death have been carried out, none of which led to an overall consensus among the researchers. Identical twins are good models to study epigenetic changes associated with senescence. MicroRNAs are small non-coding regulatory RNA molecules known as one of the epigenetic mechanisms involved in the aging process. The aim of this study was to compare some of miRNAs expression associated with aging in pairs of identical twins.

Materials and Methods: In this study, variations in expression of miR-106a, miR-24 and miR-107 whose target genes are associated with cell cycle regulation, in six pairs of identical twins within two age ranges of 15 - 17 and 45 - 50 years old were studied using qRT-PCR technique.

Results: There was a significant difference in expressions of miR-24, miR-106a and miR-107 (Fold change= 22 and 37) between two age ranges. Also, the level of discordance in expression of all three miRNAs between twins increased with aging (Fold change= 401 and 733).

Conclusion: Increase in the expression of miR-106a, miR-24 and miR-107 may be considered as a marker of aging. A trend rising differences in expression levels related to aging may confirm the environmental effects on the identical twins.

Keywords: *Twins, Epigenetic, miRNA, Ageing*