

# بیان متفاوت miR-146 در خون محیطی بیماران مبتلا به COPD، در مقایسه با افراد سالم

ندا معطر حسینی<sup>۱</sup>، عبدالرضا محمدنیا<sup>۲\*</sup>، فرزانه حسینی<sup>۱\*</sup>، نغمه بهرامی<sup>۳</sup> و<sup>۴</sup>

- (۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
- (۲) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- (۳) گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- (۴) مرکز تحقیقات جراحی فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## چکیده:

بیماری انسداد ریوی مزمن (COPD) با ماندگاری و التهاب بیش از حد، ضایعات آلوئولار، کاهش سریع در عملکرد ریه و محدودیت جریان هوا مشخص می‌شود. از سوی miRNAهای متعدد نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای التهابی مانند COPD دارند. در این مطالعه به بررسی بیان متفاوت miR-146 در خون محیطی بیماران مبتلا به COPD نسبت به افراد سالم پرداختیم. در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۳۰ نمونه خون محیطی بیمار مبتلا به COPD و ۳۰ نمونه خون افراد سالم که از لحاظ متغیر زمینه‌ای سن با هم مطابقت داشتند فراهم و بر روی آنها تست Real Time PCR جهت سنجش میزان تغییرات بیان miR-146 انجام گردید. در این مطالعه بیومارکر miR-146 در خون محیطی ۱۷ نفر از ۳۰ فرد بیمار و نیز در ۴ نفر از ۳۰ فرد سالم مثبت بود. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق میزان miR-146 در افراد مبتلا به COPD نسبت به افراد سالم افزایش بیان داشته است.

تشخیص و درمان‌های مبتنی بر میکرو RNA ممکن است یک استراتژی مفید برای بهبود بیماری آسم و COPD باشد. علاوه بر توجه به اهمیت COPD در سال‌های اخیر، مطالعه عوامل تاثیرگذار بر بیماری حائز اهمیت می‌باشد. از این رو پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ای مشابه با ابعاد و حجم نمونه وسیع انجام گیرد و همچنین عوامل دخیل دیگر نیز بررسی شوند تا بتوان با رویکردهای درمانی خاص از پرداخت هزینه‌های غیر ضروری و بستری شدن‌های طولانی مدت اجتناب نمود.

واژگان کلیدی: COPD، microRNA، Real Time PCR، miR-146

## \* نویسندگان مسئول:

فرزانه حسینی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.  
عبدالرضا محمدنیا، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیک: [mohamadnia.ar@gmail.com](mailto:mohamadnia.ar@gmail.com)

**مقدمه:**

COPD بیماری است که در آن عملکرد ریه‌ها مختل شده است. به عبارت دیگر ریه‌ها ملتهب شده و مجاری هوایی تنگ می‌شوند و در نتیجه تنفس کامل، دشوارتر می‌گردد. در این بیماری کیسه‌های هوایی دچار آسیب غیر قابل برگشت می‌شوند. با این حال داروهای امروزی می‌توانند به صورت قابل توجهی بر عملکرد ریه، کیفیت زندگی، التهاب و حتی مرگ و میر تاثیر داشته باشند. در واقع COPD یک بیماری ریوی است که می‌تواند درگیری مجاری تنفسی، بافت ریه، عروق خونی و بطور معمول ترکیبی از این اختلالات را ایجاد کند. مهمترین علت بیماری انسداد ریوی مزمن مصرف سیگار است و اکثر افراد سیگاری این بیماری را به صورت پنهان دارند. البته عوامل دیگری همچون آلودگی هوا و وراثت نیز نقش کمتری در ایجاد آن دارند [۱، ۲]. اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری شامل مواردی همچون تنگی نفس، سرفه و ایجاد خلط سینه است [۳]. بیشتر افرادی که برونشیت مزمن دارند، به COPD مبتلا هستند [۴]. تشدید حاد COPD می‌تواند منجر به کاهش کیفیت زندگی بیماران، کاهش عملکرد ریه و افزایش خطر مرگ شود. همچنین آلودگی هوا سلامت انسان را به ویژه برای بیماران مبتلا به COPD و عفونت‌های حاد تنفسی بسیار تحت تاثیر قرار داده و خطر مرگ را می‌دهد. مطالعات نشان داده‌اند که درجه حرارت هوا و کیفیت هوا از مهمترین عواملی است که بیماران مبتلا به COPD را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با کاهش دما، تعداد موارد تشدید حاد COPD و شدت بیماری به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد [۵]. میکروRNAها گروهی از RNAهای حفاظت شده تک رشته‌ای کوتاه بین ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید و غیر کد کننده هستند که به عنوان تنظیم کننده‌های بعد از رونویسی بیان ژن، در حیوانات، گیاهان و ویروس‌ها، عمل می‌کنند [۶]. میکروRNAها به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی در پاتوژن و پیشرفت بیماری‌های مزمن مجاری تنفسی و به طور عمده در آسم و COPD شناخته شده‌اند [۷]. مطالعات نشان داده شده‌اند که بیان miR-146a در بافت ریه موش‌های مبتلا به بیماری آسم بالاتر از گروه کنترل بوده است بطوری که ممکن است روند پیشرفت

آسم را تنظیم کند [۸]. همچنین در بیماران مبتلا به آسم نقش نظارتی miR146 در التهاب دیده شده است. سیتوکین‌های التهابی موجب بیان miR-146 می‌شوند. گاهی miR-146 به عنوان یک تنظیم کننده درون سلولی نیز عمل می‌کند [۹]. از این رو این مطالعه به بررسی تفاوت بیان miR-146 در خون محیطی بیماران مبتلا به COPD و افراد سالم با استفاده از تکنیک Real-time PCR می‌پردازد.

**مواد و روش‌ها:**

بدنبال اخذ مجوز از کمیته اخلاق، این مطالعه در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در بیمارستان دکتر مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. تعداد ۳۰ نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به COPD قطعی (با نظر پزشک متخصص ریه) جمع‌آوری گردید. معیار ورود به مطالعه داشتن علائم تنفسی مثل سرفه خشک پایدار، تب، خس‌خس، تنگی نفس، خلط و از این قبیل بودند و معیار خروج از مطالعه علائمی مثل آسم، آلرژی و بیماری سل بود. همچنین ۳۰ نمونه خون افراد سالم نیز جمع‌آوری شد. در این بررسی تطابق سنی بین گروه‌های بیماران و افراد سالم در نظر گرفته شد. از کلیه افراد مشارکت کننده در تحقیق ۳ میلی‌لیتر خون محیطی اخذ گردید. این نمونه‌ها در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله وارد مرحله استخراج RNA شدند. پیش از نمونه‌گیری رضایتنامه کتبی از کلیه بیماران گرفته شد.

**استخراج RNA و سنتز cDNA برای میکروRNA**  
این مرحله با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (qiagen Cat no.75144) انجام شد. سپس برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی گردید و میزان جذب آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجش شد. همچنین در این مطالعه از کیت ZIST ROYESH برای ساخت cDNA استفاده شده است.

**انجام واکنش Real-time PCR**

کیت ZIST ROYESH حاوی مواد لازم جهت انجام Real-time PCR شامل پرایمرهای Forward و Reverse SYBR Master Mix Green می‌باشد.

جدول ۱- دماها و زمان‌های واکنش Real-time PCR

سیکل	زمان سیکل	دما
۱	۱۵ دقیقه	۹۵°C
۳۵ تا ۴۰	۱۵ تا ۳۰ ثانیه	۹۵°C
	۶۰ ثانیه	۵۵°C تا ۶۰°C
۱	آنالیز ذوب	۹۵°C تا ۵۵°C

جدول ۲- ویژگی‌های دموگرافیک بیماران

جنس	مرد	۱۸
	زن	۱۲
علائم	خلط شدید	۱۹
	تنگی نفس	۱۱
بیماری زمینه‌ای	دارد	۱۴
	ندارد	۱۶
میانگین سنی		۵۸ ± ۷.۲

افراد سالم و چه در گروه افراد بیمار داشتند، مشخص شدند. بیومارکر miR-146 در خون محیطی گروه افراد بیمار در ۱۷ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود. میزان این بیومارکر در گروه افراد سالم ۴ نفر از ۳۰ نفر بود.

مقایسه آماری میزان مثبت شدن این بیومارکر در گروه افراد بیمار و گروه افراد سالم با استفاده از آزمون T صورت گرفت که نشان دهنده تفاوت آماری معناداری بین این دو گروه مورد مطالعه بود ( $P\text{-value} < 0.001$ ).

#### محاسبه تفاوت میزان بیان بیومارکرها در دو گروه تحقیق

ابتدا Ct هر نمونه تعیین گردید. میزان تفاوت بیان بیومارکر بین نمونه آزمایش در مقابل کنترل اندازه‌گیری شد، این کار با روش  $\Delta\Delta Ct$  صورت گرفت. پس از انجام محاسبات، میزان بیان این مارکر در افراد بیمار ۱/۸۴ برابر افراد سالم برآورد شد.

#### بحث:

بیماری انسدادی مزمن ریوی یکی از علل اصلی مرگ در کشورهای در حال توسعه است که میزان مرگ و میر ناشی از آن در حال افزایش می‌باشد. در این بیماری انسداد راه‌های هوایی به طور کامل برگشت پذیر نبوده، محدودیت راه‌های هوایی ماهیت پیشرونده داشته و با پاسخ التهابی غیرطبیعی ریه در برابر ذرات و گازهای مضر و خطرناک در ارتباط است [۱۰].

جهت نرمالایز کردن بیان miRNA از U6 به عنوان کالیبراتور (house keeping) استفاده گردید.

اجزا واکنش Real-time PCR به ترتیب ۴ میکرولیتر master mix، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F و R و ۲ میکرولیتر از cDNA بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

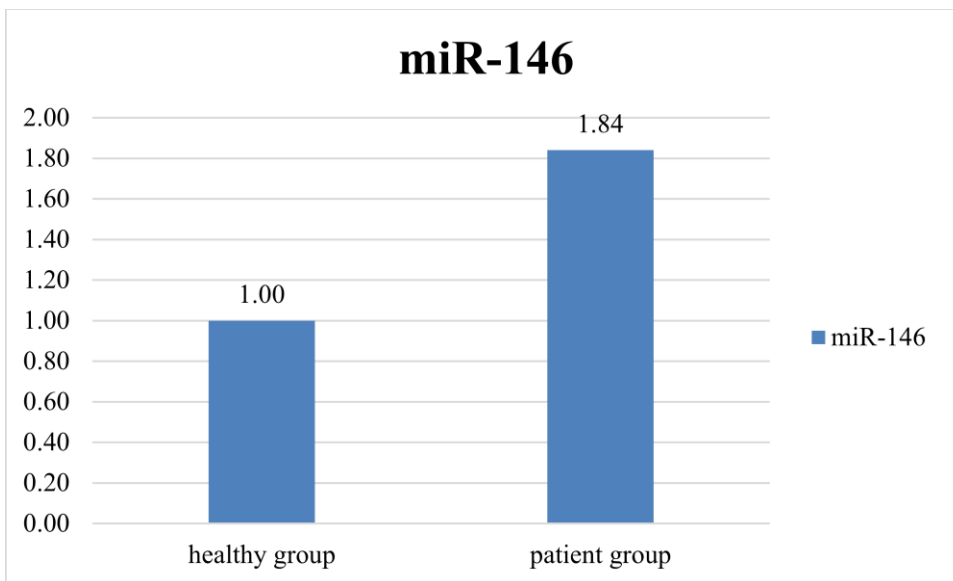
دماها و زمان‌های واکنش مطابق دستورالعمل کیت تنظیم گردید. پس از پایان هر واکنش تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های Amplification و Melting peak صورت گرفت (جدول ۱).

#### یافته‌ها:

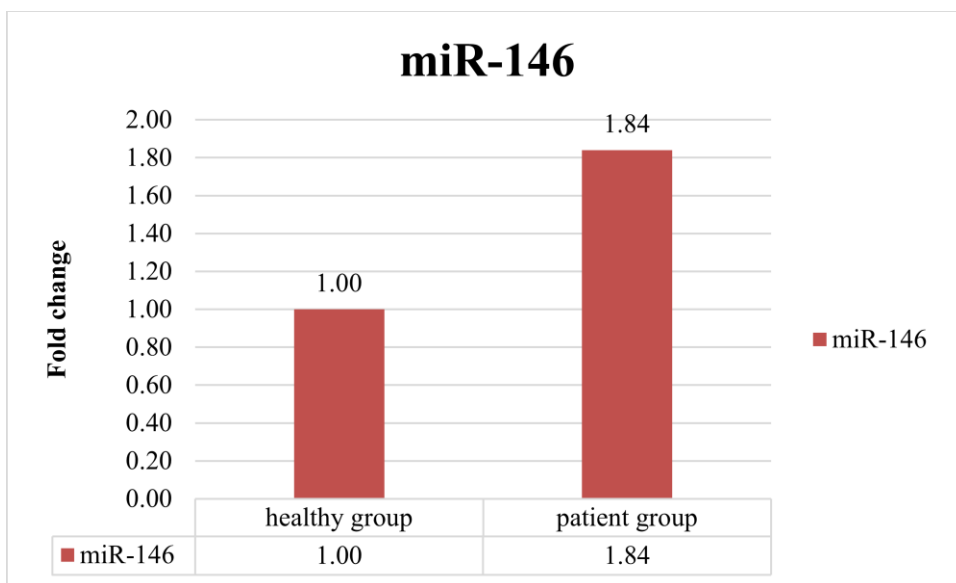
همان طور که پیش‌تر گفته شد، در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به COPD و ۳۰ نمونه خون سالم مورد بررسی قرار گرفتند. این ۲ گروه از لحاظ متغییر زمینه‌ای سن با هم مطابقت داشتند. گروه‌ها با استفاده از آزمون t از نظر میانگین سنی مقایسه شدند که تفاوت معناداری را نشان ندادند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور سن در گروه‌های مورد مطالعه اشکالی ایجاد نمی‌کند. جدول ۲، ویژگی‌های دموگرافیک بیماران شرکت کننده در مطالعه را نشان می‌دهد.

#### آنالیز بیان بیومارکرها در مورد مطالعه

پس از جمع‌آوری نتایج واکنش Real-time PCR، افرادی که نتایج مثبتی برای بیان بیومارکر چه در گروه



شکل ۱ - درصد مثبت شدن miR-146 در خون محیطی نمونه‌های بیمار و نرمال



شکل ۲ - تفاوت بیان miR-146 در خون محیطی نمونه‌های بیمار و نرمال

همچنین به عنوان مارکر تشخیصی و درمان کاربرد داشته باشند.

کوران و همکاران ۳۰ نمونه خلط القایی از بیماران مبتلا به COPD و بیماران کنترل شده را بررسی کردند. روش آنها PCR یک مرحله‌ای بود، از این رو خطر بیشتری از آلودگی و عدم توانایی در اندازه‌گیری وجود داشت [۱۱]. اما Real-time PCR تکنیکی است که برای تشخیص انواع مختلف پاتوژن‌های معمول و غیر عادی حساسیت

در بسیاری از سلول‌ها و مولکول‌های هدف، میکروRNAها در پاتوژن COPD دخیل هستند و می‌توان از آنها بعنوان بیومارکر در تشخیص و درمان استفاده کرد. در این مطالعه با توجه به اهمیت موضوع به بیان miR-146 در نمونه‌های خون محیطی بیماران مبتلا به COPD نسبت به افراد سالم پرداختیم. با توجه به بررسی‌های به عمل آمده و مرور مقالات میتوان اذعان داشت که میکروRNAها می‌توانند در تنظیم بیان ژن و

نسبت به افراد سالم بیشتر است. مشاهدات فوق کاملاً معمول می‌باشد، چرا که بیان miR-146a اغلب افزایشی گزارش شده است.

تشخیص‌ها و درمان‌های مبتنی بر میکروRNA ممکن است یک استراتژی مفید برای بهبود اثر درمانی آسم و COPD شدید باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ای مشابه با ابعاد و حجم نمونه وسیع انجام شود. چرا که بررسی تعداد بیشتر و پیگیری طولانی مدت بیماران با ریسک فاکتور بالا می‌تواند رهنمودهای بیشتری داشته باشد. همچنین لازم است عوامل و ژن‌های دخیل دیگر نیز بررسی شوند تا بتوان به رویکردهای تشخیصی و درمانی خاص پرداخت.

#### منابع:

- 1) Patel AR, Patel AR, Singh S, Singh S, Khawaja I. Global initiative for chronic obstructive lung disease: the changes made. *Cureus*. 2019;11(6):e4985.
- 2) Sethi S. Molecular diagnosis of respiratory tract infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(Suppl4):S290–295.
- 3) Soriano JB, Zielinski J, Price D. Screening for and early detection of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2009;374(9691):721–732.
- 4) Ullah R, Ashraf S. Chronic obstructive lung disease: A rising problem for the world. *Pakistan Journal of Chest Medicine*. 2017;23(4):130–133.
- 5) Cohen AJ, Ross Anderson H, Ostro B, et al. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2005;68(13-14):1301–1307.
- 6) Szymczak I, Wieczfinska J, Pawliczak R. Molecular background of miRNA role in asthma and COPD: an updated insight. *BioMed Research International*. 2016;2016:7802521.
- 7) Stolzenburg LR, Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights. *Biological Chemistry*. 2018;399(3):219–234.
- 8) Shi ZG, Sun Y, Wang KS, Jia JD, Yang J, Li YN. Effects of miR-26a/miR-146a/miR-31 on airway inflammation of asthma mice and asthma children. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019;23(12):5432–5440.
- 9) Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular Biology International*.

بالایی دارد. با توجه به این که روش Real-time PCR رایج‌ترین تکنیک برای تشخیص miRNAها می‌باشد ما در این مطالعه از روش Real-time PCR برای شناسای بیومارکرها استفاده کردیم.

در مطالعه دیگری Kivihall و همکاران نشان داده‌اند که بیان miR-146a به طور قابل توجهی در بیوپسی سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی بیماران مبتلا به آسم کاهش می‌یابد و ارتباط منفی بین کاهش بیان miR146a و تعداد نوتروفیل‌های موجود در مجاری هوایی وجود دارد [۱۲].

Shi و همکاران نشان دادند که بیان miR-146a در بافت ریه موش‌هایی با بیماری آسم بالاتر از گروه کنترل بود. بنابراین miR-146a ممکن است روند پیشرفت آسم را تنظیم کند [۸].

همچنین مطالعه Ma و همکارانش نشان داد که بیماران مبتلا به آسم شدید، بیان کمتری از miR-146a در T سل‌های CD4+ و CD8+ دارند [۱۳]. با این حال، مشاهدات فوق کاملاً غیرمعمول است و اغلب موارد بیان miR-146a افزایشی گزارش شده است [۱۴].

با استفاده از فیروبلست ریه انسان، Sato و همکاران نشان دادند که کاهش بیان miR-146a در بیماران مبتلا به COPD باعث افزایش بیان PGE-2 می‌شود [۱۵].

Yang و همکارانش برای بررسی اثر miR-146a در التهاب ملتحمه ایجاد شده توسط مواد آلرژی‌زا، شاخص‌های پاتولوژیک موش AC را پس از بیان بیش از حد miR-146a ارزیابی کردند [۱۶]. بیان بیش از حد miR-146a می‌تواند سطح IgE را در سرم کاهش دهد [۱۶].

در مطالعه ما بیومارکر miR-146 در خون محیطی گروه افراد بیمار در ۱۷ نفر از ۳۰ نفر مثبت بود. میزان این بیومارکر در گروه افراد سالم ۴ نفر از ۳۰ نفر بود. مقایسه آماری میزان مثبت شدن این بیومارکر در گروه افراد بیمار و گروه افراد سالم صورت گرفت که نشان دهنده تفاوت آماری معناداری بین این دو گروه مورد مطالعه بود. میزان بیان این مارکر در افراد بیمار ۱/۸۴ برابر افراد سالم برآورد گردید. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق میزان miR-146 در افراد مبتلا به COPD

2011;2011:437301.

- 10) Mohaghegh-Mortazavi H, Bahrami N, Naji T, Mohamadnia A. Investigating the presence of Haemophilus influenzae in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using molecular method. *Journal of Isfahan Medical School*. 2019; 37(527):517-521.
- 11) Desai H, Eschberger K, Wrona C, et al. Bacterial colonization increases daily symptoms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014;11(3):303-309.
- 12) Kivihall A, Aab A, Soja J, et al. Reduced expression of miR-146a in human bronchial epithelial cells alters neutrophil migration. *Clinical and Translational Allergy*. 2019;9:62.
- 13) Ma Z, Teng Y, Liu X, et al. Identification and functional profiling of differentially expressed long non-coding RNAs in nasal mucosa with allergic rhinitis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2017;242(2):143-150.
- 14) Hermann H, Runnel T, Aab A, et al. miR-146b probably assists miRNA-146a in the suppression of keratinocyte proliferation and inflammatory responses in psoriasis. *Journal of Investigating Dermatology*. 2017;137(9):1945-1954.
- 15) Sato T, Liu X, Nelson A, et al. Reduced miR-146a increases prostaglandin E2 in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;182(8):1020-1029.
- 16) Yang Y, Yin X, Yi J, Peng X. MiR-146a overexpression effectively improves experimental allergic conjunctivitis through regulating CD4+ CD25- T cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017;94:937-943.

# Different Expression of miR-146 in Peripheral Blood of COPD Patients, Compared to Healthy Individuals

Neda Moattar Husseini<sup>1</sup>, Abdolreza Mohamadnia<sup>2\*</sup>,  
Farzaneh Hosseini<sup>1\*</sup>, Naghmeh Bahrami<sup>3,4</sup>

- 1) Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- 2) Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 3) Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4) Craniomaxillofacial Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Abstract:

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by persistence and excessive inflammation, alveolar lesions, rapid decline in lung function and limited airflow. Numerous miRNAs play an important role in regulating inflammatory processes such as COPD. In this study, we investigated the different expression of miR-146 in the peripheral blood of COPD patients, compared to healthy individuals. In this descriptive cross-sectional study, 30 peripheral blood samples of patients with COPD and 30 healthy blood samples were obtained. The two groups were consistent in terms of age variables. The real-time PCR test was performed to measure the expression changes of miR-146. As the circulating biomarker in peripheral blood, miR-146 was positive in 17 out of 30 patients and 4 out of 30 healthy individuals. Furthermore the study results showed that the amount of miR-146 in people with COPD was increased, compared to healthy people. Thus, diagnosis and treatment of COPD patients by microRNA evaluation may be a useful strategy. Furthermore, due to important considering of COPD in recent years, the study of the influencing factors on the disease is valuable. So, It is suggested that some related studies with higher sample size and also consideration of other involved factors be performed; in order to find specific treatment approaches and avoid unnecessary costs and long-term hospitalization.

**Keywords:** COPD, microRNA, Real-time PCR, miR-146

---

## \* Corresponding Authors:

Farzaneh Hosseini. Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abdolreza Mohamadnia. Chronic Respiratory Diseases Research Center, NRITLD, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: [mohamadnia.ar@gmail.com](mailto:mohamadnia.ar@gmail.com)